Die quantitative papierchromatographische Analyse von Sacchariden und Proteinen, insbesondere von tierischen Toxinen

---

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Dipl.-Chem.

Helmut Dörfel

geboren zu Schima

Würzburg 1954

Berichterstatter: Prof. Dr. F. G. Fischer

Die vorliegende Dissertation ist in ihren wesentlichen Ergebnissen niedergelegt in der Biochemischen Zeitschrift, Band 324, unter den Titeln:

Das Gift der Honigbiene, II. Mitteilung. Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Bienengift-Fraktionen, Seite 465-475.

Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweißhydrolysaten, Seite 544-566.

sowie in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 297, unter den Titeln:

Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Crotoxin. (Schlangengifte IV) Seite 278-282.

Die quantitative Bestimmung reduzierender Zucker auf Papierchromatogrammen, Seite 164-178

von F. G. Fischer und Helmut Dörfel.

Diese Sonderdrucke liegen hier vor.

Tag der mündl. Prüfung:

26. Okt. 1954

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiß-Hydrolysaten.

Mit 3 Textabbildungen.

Es fehlt nicht an Versuchen und Vorschlägen, um die Aminosäuren eines Eiweiß-Hydrolysats nach erfolgter papierchromatographischer Trennung auch quantitativ zu bestimmen [1, 3, 4, 5]. Die exakte Gestaltung einer solchen Bestimmung böte verständlicherweise große Vorteile den Analysenmethoden gegenüber, die Trennungen in der Säule einbegreifen.

Anläßlich einer Untersuchung der im Bienengift enthaltenen Proteine stellten wir uns die Aufgabe, die Aminosäuren-Zusammensetzung sehr kleiner Mengen eines Eiweißstoffes quantitativ zu ermitteln. Wir erzielten schließlich auf papierchromatographischem Wege befriedigende Ergebnisse durch eine Kombination von Verfahren, die uns im Vergleich mit den bisher angegebenen wesentliche Vorzüge zu haben scheint. Das Prinzip ist folgendes: Das zu analysierende Gemisch von Aminosäuren wird nach *strichförmiger* Auftragung auf das Papier durch *ein*dimensionale Chromatographie getrennt; die dann unter bestimmten Bedingungen entwickelten *Ninhydrinfärbungen* der einzelnen Aminosäuren werden als *Kupfersalze in Lösung* gebracht und lichtelektrisch gemessen. Zur *Eichung der gefundenen Werte* läuft in *jedem* Versuch ein Gemisch aus bekannten Mengen der zu bestimmenden Aminosäuren mit.

Das Verfahren erscheint auf den ersten Blick umständlich und es drängt sich die Frage auf, warum nicht einfachere Methoden, wie sie von anderen Autoren schon vorgeschlagen sind, den Vorzug verdienen. Wir wollen daher zunächst die experimentellen Gründe darlegen, die zu der skizzierten Arbeitsweise geführt haben.

Die eindimensionale Chromatographie.

Die einfachste Trennung von Aminosäuren, die zu ihrer schnellsten qualitativen Erkennung führt, ist ohne Zweifel die zweidimensionale Verteilung auf dem Papierbogen. Wir fanden, daß *zweidimensionale Chromatogramme* für quantitative Zwecke jedoch nicht geeignet sind, und zwar aus mehreren Gründen: Die Trennung gelingt nur äußerst selten bei allen Bestandteilen mit zureichender Schärfe; für das Paar Leucin-

Isoleucin z. B. ist es die Regel, daß die Flecken verwachsen bleiben. Da das Hydrolysat punktförmig auf das Papier gebracht werden muß, lassen sich höchstens 150—200 γ Aminosäurengemisch pro Versuch verteilen, denn die Trennungen werden bekanntlich um so schlechter, je größer die aufgetragene Stoffmenge pro Flächeneinheit ist. Damit wird aber die Bestimmung jener Aminosäuren, die nur in geringem Prozentsatz im Gemisch enthalten sind, sehr ungenau, selbst wenn die Lokalisation der gewanderten Flecken dieser Komponenten scharf gelingen und ihre Bestimmungsreaktion, z. B. mit Ninhydrin in Lösung, gut reproduzierbar sein sollte. Der stärkste Einwand gegen die quantitative Auswertung zweidimensionaler Chromatogramme ist jedoch, daß selbst die genaueste Bestimmung der getrennten Aminosäuren keine Auskunft gibt über die ursprünglich im Startfleck vorhandenen Mengen. Das Mitwandernlassen eines Vergleichsgemisches bekannter Zusammensetzung ist zweidimensional ohne Überschneidung der Bahnen kaum möglich; es läßt sich daher auch nicht ermitteln, welche Bruchteile der aufgetragenen Mengen unter den besonderen Bedingungen der Versuche in den getrennten Flecken bestimmt werden können.

Bei *eindimensionaler Entwicklung* ist es hingegen möglich, neben der unbekannten Mischung eine solche bekannter Zusammensetzung unter völlig gleichen Bedingungen wandern zu lassen, und so exakte Bezugswerte zu gewinnen. Außerdem ist es möglich, durch Auftragen der Lösungen als Strich, wie es z. B. von E. Hiller, F. Zinnert und G. Frese [9] für die bequeme Auswertung von Chromatogrammen im Elphor-Photometer empfohlen wurde, größere Mengen Substanz wandern zu lassen und dabei die Konzentration pro Zentimeter Startlinie so niedrig zu halten, daß eine scharfe Trennung gesichert ist (z. B. 150—400 γ Hydrolysat auf 4 cm Startlinie; derart lassen sich auf einem Papierbogen von 60 × 53 cm 4 Analysenproben und 4 Vergleichsproben gleichzeitig entwickeln [siehe Abb. 1]).

Wir fanden die von E. F. McFarren [5] angegebenen Trennungsverfahren mit gepufferten Verteilungsmedien und gepuffertem Papier ausgezeichnet geeignet, um die meisten Aminosäuren im eindimensionalen Chromatogramm scharf zu isolieren, und um sie dann nach dem eingangs angegebenen Prinzip zu bestimmen.

Die Abtrennung von *Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glykokoll, Threonin, Alanin, Tyrosin* (nach steigenden R_f-Werten geordnet) gelingt in 24 Std (bei 20°) durch Entwickeln mit Phenol, welches mit einer Pufferlösung vom p_H 12 gesättigt ist. Phenol vom p_H 1 dient zur Isolierung von *Cystin, Alanin, Tyrosin, Valin* und Methionin. Lutidin vom p_H 6,2 scheidet *Lysin* und *Arginin* in 35 Std. *Phenylalanin* wird mit o-Kresol vom p_H 6,2 als Verteilungsmedium in 24 Std isoliert. *Leucin* und *Isoleucin*, die in den meisten Verteilungssystemen fast gleiche R_f-Werte haben, werden befriedigend getrennt im absteigenden Durchlaufchromatogramm durch eine n-Butanol-Benzylalkohol-Mischung vom p_H 8,4. Auch die ungepufferte

Mischung tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser (nach R. A. Boissonnas [3]) eignet sich gut zur Trennung dieser beiden isomeren Aminosäuren, aber nur, wie wir feststellten, wenn Phenylalanin fehlt, da sonst diese Aminosäure die Isoleucin-Werte fälscht.

Prolin muß auf einem gesonderten Chromatogramm nach eindimensionaler Verteilung, am besten mit tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser, und Blaufärbung mit Isatin auf dem Papier photometriert werden. Der *Tryptophan*-Wert wird durch Messung der U. V.-Absorption der Analysenlösung ermittelt (nach T. W. Goodwin und J. A. Morton [7]). *Histidin* wird mit Hilfe der Paulyschen Reaktion in der Ausführung nach H. T. Macpherson [10] bestimmt.

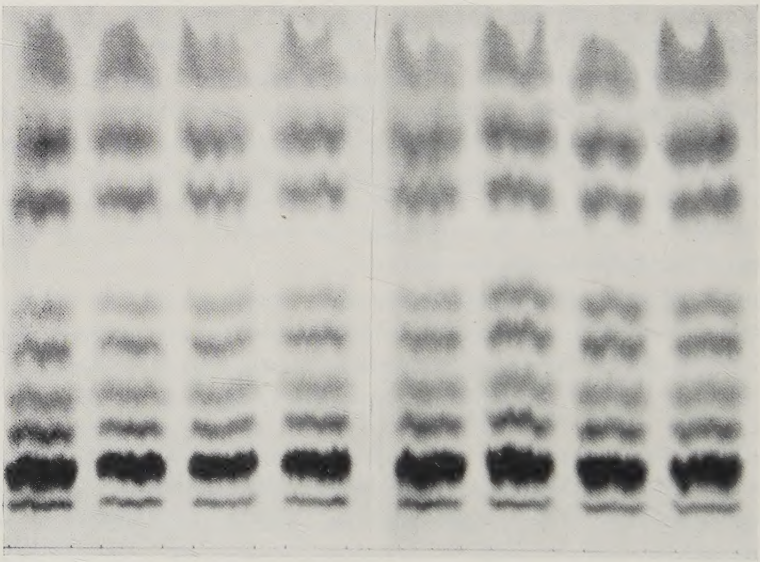

Abb. 1. Papierchromatogramm eines Gemisches von 16 Aminosäuren (nach Tab. 7). Mit Phenol von p_H 12 entwickelt. Ausgewertet werden nur die 7 unteren Streifen. Von unten nach oben: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glykokoll, Threonin, Alanin, Tyrosin. Streifen von li. nach re.: 1, 1′, 2, 2′, 3, 3′, 4, 4′. Aufgetragen waren auf 1 und 2 je 10 mm³, auf 3 und 4 je 15 mm³ Analysenlösung; auf 1′ und 2′ je 10 mm³, auf 3′ und 4′ je 15 mm³ Vergleichslösung.

Mit welcher Genauigkeit ist die Bestimmung der getrennten Aminosäuren möglich?

Zu welchem Prozentsatz findet man z. B. die als Gemisch auf das Papier gebrachten Aminosäuren nach der Verteilung auf den getrennten Plätzen wieder? Diese Frage ist unseres Wissens bei den bisher vorgeschlagenen Methoden zur quantitativen Auswertung von Papierchromatogrammen nie systematisch geprüft worden. Sie ist jedoch wesentlich für die Beurteilung der Möglichkeit einer Ermittlung von „Eichkurven", d. h. von immer wieder verwendbaren Bezugswerten. Wie oben erwähnt, würde selbst eine sehr genaue Aminosäurenbestimmung, z. B. in den einzelnen Flecken eines zweidimensionalen Chromatogramms, wenig helfen, wenn das Verhältnis dieser Mengen zu jenen, die ursprünglich im Startfleck

vorhanden waren, unbekannt ist, oder von Versuch zu Versuch sich ändern kann.

Wir geben als Beispiel eine Versuchsreihe wieder (Tab. 1), in der 17.10^{-8} Mol Threonin und 17.10^{-8} Mol Alanin einzeln und im Gemisch auf dem gleichen Papierbogen mit Phenol von p_H 12 chromatographiert (24 Std, 20°) und unter den allgemein in dieser Arbeit angewandten Bedingungen (siehe S. 563) mit Ninhydrin zur Reaktion gebracht (20 min bei 60°) und als Kupfersalz des gebildeten Farbstoffs in Lösung photometriert wurden. Zur Bestimmung der Extinktionen der Ausgangsmengen wurden diese vor der Ninhydrin-Reaktion, nach Chromatographie und Entfernung des Phenols, auf leere Bahnen des gleichen Papierbogens aufgetragen. Da auch die Frage interessierte, ob die Aminosäuren nach der Verteilung sich nur auf dem sichtbarwerdenden Strich finden, oder auch diffus auf der ganzen überwanderten Bahn, wurde der Papierbogen nach dem Besprühen mit Kupfersalz quer zur Entwicklungsrichtung in Streifen von 2,5 cm Breite zerschnitten, die zur Photometrierung wiederum, den einzelnen Bahnen entsprechend, in gleich große Stücke zerschnitten wurden.

Die ersten Streifen nach der Startlinie enthalten keine meßbaren Mengen Aminosäure; ihre Extinktionswerte gleichen durchweg den „Leerwerten" der Papierstücke (im Mittel 24), die in Tab. 1 schon abgezogen sind. Der Anstieg der Konzentrationen zur dichtesten Zone (Hauptstrich bei Threonin: Streifen Nr. 6; bei Alanin: Nr. 7) findet bei beiden Säuren auf kurzer Strecke statt. Größer sind die Mengen Aminosäuren, die dem Hauptstrich *vor*gelagert sind (Threonin: Streifen Nr. 7 und 8; Alanin: Nr. 8). Diese „Zungen" vor den Hauptstrichen greifen bei nahe aneinanderliegenden Zonen (geringe R_f-Unterschiede) in das Gebiet der vorgelagerten Substanz über (beim Gemisch: Streifen Nr. 6, 7 und 8). Daher sind die „Verluste" bei Threonin größer als bei Alanin.

Es tritt hier also die umgekehrte Erscheinung auf, wie bei der wohlbekannten „Schwanzbildung": Die asymmetrisch gewordene Verteilungskurve des Chromatogrammstreifens greift in der Flußrichtung vor. Selbst bei scharf erscheinenden Trennungen können also die für eine Komponente gefundenen Werte nicht nur durch Nachschleppen der vorwandernden Komponente, sondern auch durch „Zungenbildung" der nachwandernden erhöht werden[1].

Die relativ sehr hohen „Verluste" (Tab. 1) sowohl der einzeln wie der im Gemisch gewanderten Aminosäuren zeigen deutlich, welche groben Fehler begangen werden können, wenn die nach der Chromatographie

[1] Diese Erscheinung der „Zungenbildung" wird sehr wahrscheinlich verursacht durch die Änderungen in der Zusammensetzung der Verteilungsflüssigkeit, die auch in einem gut „dampfgesättigten" Papierbogen in der Nähe der Flüssigkeitsfront stattfinden.

Tabelle 1. *„Verluste" bei der Chromatographie von Threonin und Alanin.*

	$E_{504} \cdot 10^3$ des Kupfersalzes der Ninhydrinfärbung							„Verlust" in %
	Querstreifen Nr.					gewandert	auf-	
	5	6	7	8	9	Summe	getragen	
Threonin[1] . .	4	511	73	20	0	608	1007	39
Alanin . . .	—2	3	491	140	3	637	901	29
Thr. + Alan.	11	641	515	143	0	1310	1908	31

[1] Je 17.10^{-8} Mol Aminosäure in 30 mm³ Lösung auf 4 mm Startlinie aufgetragen; entwickelt mit Phenol p_H 12, 24 Std, 20°. Angegeben sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

bestimmten Mengen den ursprünglich im Gemisch vorhanden gewesenen gleichgesetzt werden. Die Ursache der „Verluste" ist, wie oben dargelegt, keine diffuse „Schwanzbildung". Wir kommen im nächsten Abschnitt darauf zurück.

Die „Verluste" an Aminosäuren und auch die „Zungenbildung" vor den einzelnen Zonen werden relativ geringer, wenn Gemische aus zahlreichen Komponenten chromatographiert werden.

Tab. 2 gibt die Ergebnisse einer Versuchsreihe wieder, in der geprüft wurde, wie bei den 6 angegebenen Aminosäuren die relativen „Verluste" der einzeln wandernden Komponenten sich unterscheiden von den bei der Trennung des Gemisches eintretenden Einzelverlusten. Das Gemisch enthielt in diesem Falle 16 Komponenten in äquimolaren Mengen.

Man erkennt, daß die Einzelwanderung in jedem Falle verlustreicher ist, als die Wanderung mit und aus den Begleitern. Die „Fehlprozente"

Tabelle 2. *Vergleich der „Verluste" der Aminosäuren bei Chromatographie eines Gemisches (aus 16 Säuren) und bei Einzelwanderung.*

	Auf 4 cm Startlinie aufgetragene Menge der A. S. (einzeln bzw. im Gemisch) in γ	$E_{504} \cdot 10^3$ für je $2 \cdot 10^{-7}$ Mol Aminosäure		Differenz der Extinktionen $\cdot 10^3$	
		im Gemisch gewandert	einzeln gewandert	absolut	in %
Asparaginsäure .	26,6	380	369	11	2,9
Glutaminsäure .	29,4	1047	987	60	5,7
Serin	21,0	899	885	14	1,6
Glykokoll . . .	15,0	563	469	94	16,7
Threonin	23,8	833	736	97	11,6
Alanin	17,8	835	760	75	9,0
Summe	133,6	4557	4206	351	7,7
Gemisch	444,2				

Die Lösung des Gemisches enthielt die 16 Aminosäuren von Tab. 7 in äquimolaren Mengen. In den auf das Papier gebrachten 25 mm³ waren $16 \cdot 2 \cdot 10^{-7}$ Mol enthalten. Entwicklung des Gemisches und der einzelnen Säuren auf dem gleichen Papierbogen mit Phenol p_H 12; 24 Std. 20°. Weiterbehandlung wie im experimentellen Teil angegeben. $E_{504} \cdot 10^3$ des Cu-Salzes der Ninhydrinfärbungen. Mittelwerte aus 4 Bestimmungen (Gemisch) bzw. 2 Bestimmungen (Einzelsäuren).

sind wieder von Säure zu Säure sehr verschieden und nicht etwa von der Weglänge (R_f-Wert) abhängig.

Aus den Zahlen von Tab. 3 ist schließlich ersichtlich, welche Prozentsätze einzelner Aminosäuren bei der Trennung eines bestimmten, ad hoc hergestellten Gemisches aus 16 Komponenten (die Zusammensetzung ist in Tab. 7, vorletzte Spalte, angegeben) in den getrennten Streifen nicht mehr wiedergefunden werden. Auch hier sind die „Verluste" meistens beträchtlich und von Aminosäure zu Aminosäure sehr verschieden groß. Bei der Gruppe aus 6 Säuren, die nach Trennung durch Phenol von p_H 12 bestimmt wird, ergibt sich z. B. ein Gesamtverlust von fast 10%. Der hohe „Verlust" bestimmter Komponenten, wie z. B. Threonin, Tyrosin und Isoleucin, ist wahrscheinlich zum Teil auf die erwähnte

Tabelle 3. *„Verluste" bei der chromatographischen Trennung eines Aminosäurengemisches*[1] (Differenz zwischen aufgetragenen und nach der Trennung wiedergefundenen Mengen).

	Auf 4 cm Startlinie aufgetrag. Menge A. S. (einzeln bzw. im Gemisch) in γ[2]	Aminosäure einzeln aufgetr. nichtgewandert; $E_{504} \cdot 10^3$[3]	Gemisch aufgetragen, chromatographiert; $E_{504} \cdot 10^3$	Differenz der Extinktionen	
				absolut	in %
I Asparagins. .	25,8	462	409	53	11,5
Glutamins. .	42,4	834	722	112	13,4
Serin	14,9	760	724	36	4,7
Glykokoll . .	23,7	534	539	—5	—0,9
Threonin . .	21,2	912	744	168	18,4
Alanin . . .	8,25	463	442	21	4,5
Summe . . .	136,25	3965	3580	385	9,7
II Tyrosin . . .	36,7	777	532	245	31,5
Valin	21,2	732	724	8	1,1
Summe . . .	57,9	1509	1256	253	16,8
III Isoleucin . .	17,5	578	382	196	33,8
Leucin . . .	11,85	461	470	—9	—1,95
Summe . . .	29,35	1039	852	187	18,0

[1] Gemisch aus 16 Aminosäuren in den Tab. 7, vorletzte Spalte, angegebenen Mengenverhältnissen.

[2] In 20 mm³ Lösung. Bei Glutaminsäure, Valin und Tyrosin jedoch nur je 10 mm³ aufgetragen, der hohen Konzentration dieser Säuren wegen.

[3] $E_{504} \cdot 10^3$ des Cu-Salzes der Ninhydrinfärbungen. I Mit Phenol p_H 12 entwickelt, 24 Std, 20°; II Mit Phenol p_H 1 entwickelt, 24 Std, 20°; III Mit n-Butanol-Benzylalkohol p_H 8,4 entwickelt, 40 Std, 20°. Weiterbehandlung und Bestimmung wie im Experimentellen Teil angegeben. Bei Glutaminsäure, Lösung des Cu-Salzes in 10 cm³, statt 5 cm³ Methanol. Die einzelnen Aminosäuren (Spalte 3) wurden nach entfernung der Lösungsmittel auf die leeren Vergleichsfelder der Chromatogramme des getrennten Gemisches (Spalte 4) aufgetragen, also auf dem gleichen Papierbogen bestimmt. Die in Spalte 3 und 4 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen.

Erscheinung der „Zungenbildung" zurückzuführen, da die vor ihnen liegenden Komponenten auffällig geringe „Verluste" zeigen.

Aus den in Tab. 3 wiedergegebenen Versuchen geht jedenfalls hervor, *daß es nicht möglich ist, die Mengen der chromatographierten Aminosäuren in eine einfache Beziehung zu setzen mit den im Gemisch ursprünglich vorhandenen.*

Eine weitere Erscheinung bedarf noch der Erwähnung, die wir bei der Trennung von Gemischen feststellten, in welchen auch *Cystin* enthalten ist. Der in Tab. 4 wiedergegebene Versuch zeigt, daß die Entwicklung von Lysin und Arginin durch Lutidin von p_H 6,2 in Abwesenheit von Cystin gut gelingt: die Werte der aus ihrem Gemisch getrennten Säuren stimmen fast überein mit jenen der einzeln aufgetragenen und gewanderten Säuren. Wenn aber Cystin beigemischt wird, fällt der Lysinwert und ganz besonders der Argininwert zu hoch aus. Aus anderen Versuchen ging hervor, daß auch die Serinwerte durch die Anwesenheit von Cystin erhöht werden können.

In komplexeren Gemischen mit vielen Komponenten und weniger Cystin werden die Abweichungen nach oben geringer, können jedoch immer noch 5—10% betragen. Für die genaue Bestimmung der basischen Aminosäuren und des Serins ist es also notwendig, daß die mitzuchromatographierende Vergleichsmischung und das zu analysierende Hydrolysat genau die gleiche relative Menge Cystin enthalten. Diese Menge ist

Tabelle 4. *Bestimmung von Lysin und Arginin in Gegenwart von Cystin.*

	$E_{504} \cdot 10^3$ des Cu-Salzes		Fehler in %	
	Lysin	Arginin	Lysin	Arginin
Lysin[1]	803			
Arginin		603		
Lysin + Arginin . . .	802	595	— 0,1	— 1,3
Lys. + Arg. + Cystin .	834	720	+ 3,9	+ 19,4

[1] Je 12.10^{-8} Mol Aminosäure in 6 mm³ Lösung auf 4 cm Startlinie; entwickelt mit Lutidin p_H 6,2, 40 Std, 20°; Weiterbehandlung und Bestimmung nach den Angaben des experimentellen Teils. Angegeben sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

zuvor durch eine Trennung mit saurem Phenol zu ermitteln. Man erreicht dadurch, daß die für Lysin, Arginin und Serin gefundenen Werte um höchstens 3% zu hoch werden. Wahrscheinlich erklären sich diese Störungen durch partielle Oxydation des Cystins zur Sulfosäure, welche mit den basischen Säuren reagieren kann und die Bahn des Chromatogramms gegen kleinere R_f-Werte zu „verschmiert".

Aus allen angeführten Beispielen und aus anderen Versuchsreihen geht hervor, daß selbst in gut gelungenen Chromatogrammen mit scharf getrennten Streifen, die für die einzelnen Komponenten ermittelten Werte abhängig sind von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des ganzen

Gemisches. Die relativen „Verluste" der einzelnen Aminosäuren ändern sich je nach Art, Zahl und Menge der Begleiter. Es ist daher nicht möglich, auch unter sonst gleichen und reproduzierbaren Trennbedingungen bei Gemischen *verschiedener* Zusammensetzung die in den getrennten Streifen bestimmten Aminosäuren-Mengen in eine einfache Beziehung zu bringen zu den im Gemisch vorhanden gewesenen. Die Verwendung von „Eichkurven", deren Werte durch Chromatographieren gestaffelter Mengen *einzelner* Aminosäuren ermittelt wurden, kann bei der Berechnung der Zusammensetzung eines chromatographierten *Gemisches* nicht zu genauen Werten führen.

Eine quantitative papierchromatographische Bestimmung wird nur möglich durch Mitwandernlassen von Aminosäuren-Gemischen bekannter Zusammensetzung und Bezugnahme auf die Mengen der getrennten Säuren dieser Gemische. Die Vergleichsgemische werden um so genauere Bezugswerte liefern, je näher sie in ihrer Zusammensetzung dem zu analysierenden Gemisch angeglichen worden sind (siehe Tab. 6 und Tab. 7).

Die Verwendung von Vergleichsmischungen, die auf demselben Papierbogen chromatographiert werden wie die Analysenlösung, ist schon von verschiedenen Autoren angegeben. Vergleichende Auswertung von Protein-Hydrolysaten sind ausgeführt worden nach den Prinzipien der Messung von Fleckengrößen, von der gesamten Farbstoffmenge der Flecken und von der maximalen Farbstoffdichte in den Flecken (Literaturangaben [1, 4]). Doch sind unseres Wissens die Vergleichslösungen immer schematisch aus äquimolaren Aminosäuren-Mengen gemischt worden. Die Bedeutung der Angleichung der Vergleichsmischung an das zu analysierende Hydrolysat wurde nicht erkannt.

Auf die weiteren Fehlerquellen der oben angegebenen Verfahren soll hier nicht eingegangen werden.

Die Entwicklung der Ninhydrin-Färbungen und die Photometrierung ihrer Kupfersalze in Lösung.

Es ist seit langem bekannt [8] und immer wieder bestätigt worden, daß die *Reaktion zwischen Ninhydrin und den verschiedenen Aminosäuren* nicht stöchiometrisch verläuft und daß es daher unmöglich ist, aus den gebildeten Farbstoffmengen mit Hilfe *einer* Eichkurve auf die Mengen verschiedener Aminosäuren umzurechnen. Wenn die Reaktion in wäßriger Lösung und unter bestimmten Bedingungen ausgeführt wird, ist sie allerdings so gut reproduzierbar, daß sich Faktoren für die einzelnen Aminosäuren angeben lassen [3, 11, 12]. Auf dem Papier ausgeführt, ist die Ninhydrinreaktion noch stärker von den Umständen abhängig: Je nach der angewandten Temperatur, der Erhitzungsdauer, dem Gehalt des Papiers an Feuchtigkeit und an Lösungsmittelresten kann die von einer bestimmten Aminosäurenmenge gebildete Farbstoffmenge sehr verschieden sein. Bei genauer Einhaltung konstanter Bedingungen führt jedoch die Farbentwicklung zu reproduzierbaren Werten (siehe vor allem E. F. McFarren und J. A. Mills [5]).

Wir entwickelten 20 min bei 60° nach Entfernung des Butanols der Ninhydrinlösung in einem Luftstrom von 35° (20 min). Ninhydrin muß im Vergleich zur Aminosäure in großem Überschuß vorhanden sein; diese Bedingung wird sicher erfüllt, wenn der Papierstreifen durch die 0,5%ige Lösung des Reagens gezogen wird. Die Entfernung des wassergesättigten Butanols muß so erfolgen, daß der Papierbogen möglichst gleichmäßig eintrocknet und daß eine vorzeitige, lokale Farbstoffbildung vermieden wird. Der Wassergehalt des Papiers und der Wasserdampfdruck in der Atmosphäre des Heizschranks während der Farberzeugung sind für diese von Wichtigkeit, wie wir in einigen Versuchsreihen feststellten. Es bildet sich z. B. im wasserdampfgesättigten Raum bei 60° in 20 min mehr Farbstoff als in trockener Luft, unter sonst gleichen Bedingungen. Bei höheren Temperaturen, z. B. 100°, wirkt sich die Wasserdampfkonzentration nicht mehr stark aus. Da in der Wärme der gebildete Farbstoff an der Luft nicht beständig ist, sind Dauer der Erhitzung und Höhe der Temperatur sehr wesentlich.

Die Geschwindigkeit der Reaktion der einzelnen Aminosäuren mit Ninhydrin ist verschieden; es ist daher verständlich, daß selbst das Verhältnis der von verschiedenen Aminosäuren gebildeten Farbstoffmengen bei stark abweichenden Entwicklungsbedingungen wechseln kann.

Aus den dargelegten Gründen erhält man genaue, aufeinander beziehbare Werte nur aus Chromatogrammen, die auf dem gleichen Papierbogen entwickelt und weiter behandelt worden sind. Aus den Beispielen von Tab. 5 geht hervor, daß die Bezugnahme auf die Vergleichswerte eines anderen Versuches, auch wenn er unter möglichst gleichen Bedingungen ausgeführt wurde, Fehler bis zu 25% verursachen kann (Versuch I und II). Meistens würden diese allerdings bedeutend kleiner sein (Versuch I und III).

Jedenfalls verbieten schon diese Eigenarten der Ninhydrinreaktion auf dem Papier die Aufstellung von immer gültigen Umrechnungsfaktoren und verlangen zur Ermittlung von exakten Bezugswerten das Chromato-

Tabelle 5. *Die Extinktionen der Cu-Salze der Ninhydrin-Farbe äquimolarer Mengen Aminosäuren bei 3 verschiedenen Chromatogrammen.*

	$E_{501} \cdot 10^3$ für je $2 \cdot 10^{-7}$ Mol Aminosäure			E_I/E_{II}	E_I/E_{III}
	E_I	E_{II}	E_{III}		
Glutaminsäure . . .	752	960	752	1,28	1,00
Alanin	695	908	686	1,30	1,01
Serin	635	828	637	1,30	1,00
Threonin	537	720	524	1,34	1,02
Glykokoll	330	420	346	1,27	0,96

10 mm³ Lösung eines Gemisches mit je 2.10^{-7} Mol der genannten Aminosäuren auf 4 cm Startlinie. Mit Phenol p_H 12 entwickelt, 24 Std, 20°. Weiterbehandlung und Bestimmung nach den Angaben des experimentellen Teils. Angegeben sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen.

graphieren von Vergleichslösungen auf demselben Papierbogen. Dann werden die Bestimmungen allerdings erstaunlich genau. Die Streuung unserer mehrfach ausgeführten Bestimmungen war regelmäßig sehr gering (siehe z. B. Tab. 7 unten).

Es ist daher sicher, daß z. B. die *Differenzen zwischen den Aminosäurenmengen vor und nach der Chromatographie, die „Verluste"* (Tab. 1 bis 4), nicht auf die Bestimmungsfehler zurückzuführen sind. Aufeinander bezogene Werte sind durchweg aus den Chromatogrammen *eines* Papierbogens gewonnen. Sofern diese „Fehlprozente" nicht durch die geschilderten Überlagerungserscheinungen bei der Trennung bedingt sind, sind sie echte Verluste. Ihre Ursachen mögen mannigfach sein; wir haben jedenfalls festgestellt, daß sie hauptsächlich nicht etwa während der chromatographischen Trennung, sondern während der *Entfernung der Entwicklungsflüssigkeit* eintreten. So verschwanden z. B. beim Verflüchtigen von Phenol (p_H 12) in der üblichen Weise (1,5 Std im Luftstrom von 35°) aus einem Papierbogen mit je 17.10^{-8} Mol Alanin und Threonin 7,3% bzw. 4,8% dieser Säuren (Differenz zwischen gleichen Mengen, die vor und nach der Phenolentfernung aufgetragen wurden). Beim Verflüchtigen von Lutidin p_H 6,2 (1 Std) nahmen je 17.10^{-8} Mol Lysin und Threonin um 15,3% bzw. 6,5% ab. Auch nach Entfernung von Phenol in einem Vakuum-Trockenschrank (55°, 1 Torr., 45 min) wurden „Verluste" an Alanin und Threonin von 7—10% festgestellt.

Auch L. Fowden und J. R. Penney [6] haben nach der Chromatographie von Alanin sowohl mit Phenol-Ammoniak wie mit Butanol-Eisessig Verluste bis zu 25% beobachtet und aus ihren Versuchen geschlossen, daß diese nicht Adsorptionsverluste seien, sondern eine Folge der Trocknung des Papiers (3 Std bei 75° bis 100°!). Nach den genannten Autoren sollen jedoch die Verluste fast völlig vermieden werden können, wenn das Lösungsmittel bei Temperaturen unter 50° oder durch Äther-Extraktion entfernt wird.

Bei allen unseren Versuchen wurden die auf dem Papier erzeugten Ninhydrinfärbungen durch Besprühen mit Kupfernitratlösung nach Th. Wieland und E. Kawerau [13] in das *Kupfer-Komplexsalz* verwandelt. Daß dieses Kupfersalz, wie schon F. Bode, H. J. Hübner, A. Brückner und K. Hoeres mitgeteilt haben [2], sich mit Methanol leicht extrahieren läßt, kann die Messung der Extinktion der gebildeten Farbstoffmengen in Lösung stattfinden (mit dem Beckman-DU-Gerät). Es bedarf keiner Erläuterung, daß eine solche Messung genauer ist, als auf dem Papier. Die Farbtöne der Ninhydrinreaktion sind, wie bekannt, bei manchen Aminosäuren verschieden; die Kupfersalzlösungen zeigen hingegen alle dieselbe hellrote Farbe.

Im nachgeprüften Bereich der Extinktionen 0,02—1,20 folgen die Lösungen des Kupferkomplexes dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Mißt man die von gestaffelten Mengen der verschiedenen Aminosäuren gebildeten, als Kupfersalz photometrierten Farbstoffmengen, so findet

man innerhalb des für die Bestimmungen nützlichen Bereichs ($E = 0{,}10$ bis fast 1,00, entsprechend 3 bis $20 \cdot 10^{-8}$ Mol Aminosäure) lineare Proportionalität bei allen Aminosäuren, mit Ausnahme des Glykokolls (einige Beispiele in Abb. 2).

Bei Glykokoll nimmt schon in dem genannten Bereich die gebildete Farbstoffmenge relativ so stark ab, daß lineare Extrapolationen mit Bezugswerten, die um 30% differieren, zu beträchtlichen Fehlern führen.

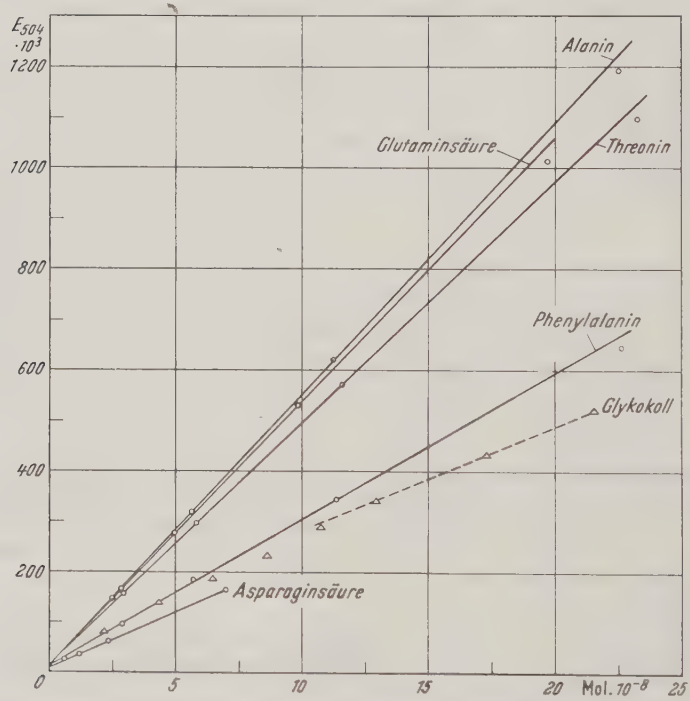

Abb. 2. Molare Farbintensitäten des Kupferkomplexes der Ninhydrinfärbung einiger Aminosäuren.

Dieses besondere Verhalten von Glykokoll bei der Ninhydrinreaktion auf dem Papier ist bisher offenbar übersehen worden. Im übrigen geben auch die anderen Aminosäuren bei größeren Konzentrationen auf dem Papier relativ geringere Farbstoffmengen, so daß keine lineare Proportionalität mehr besteht.

Alle Extinktionskurven schneiden die Ordinate etwas oberhalb des Nullpunktes, entsprechend den sehr kleinen „Leerwerten" der Papierstücke. Die Ermittlung der „Leerwerte" der verschieden großen, getrennten Farbstreifen nach Chromatographie eines Aminosäurengemisches ist im methodischen Teil, S. 565, näher angegeben.

Die von verschiedenen Autoren für Ninhydrinfärbungen angegebenen geraden „Eichlinien" sind daher schon aus diesem Grunde vermutlich der Ungenauigkeit der Messungen zuzuschreiben.

F. Bode u. Mitarb. [2] geben an, daß die molaren Farbintensitäten der Kupfersalze der Ninhydrinfärbungen von Leucin, Alanin, Glykokoll, Phenylalanin, Histidin, Glutaminsäure, Valin und Serin gleich seien und daß daher *eine* Eichgerade erhalten werde. Wie schon aus den Beispielen der Abb. 2 ersichtlich ist, können wir diese Angaben in keiner Weise bestätigen. Eine Messung der Extinktionen der Kupfersalze nach Auftragen dieser Säuren in gleichmolaren Mengen (je 10.10^{-8} Mol) auf Papier, das mit n-Butanol-Eisessig-Wasser vorbehandelt und wieder getrocknet worden war, und Entwicklung der Färbung nach den Angaben von Bode u. Mitarb. ergab, daß die molare Farbintensitäten von Valin : Alanin : Leucin : Serin : Glykokoll : Histidin : Phenylalanin sich verhalten wie die Zahlen 869 : 792 : 738 : 704 : 492 : 442 : 323. Eine scharfe Trennung des Gemisches dieser Aminosäuren mit n-Butanol-Eisessig-Wasser gelingt nicht (absteigend 24 Std, 20°). Nach Chromatographie mit Phenol p_H 12 und Farberzeugung unter unseren Bedingungen verhielten sich die molaren Farbintensitäten von Glutaminsäure : Alanin : Serin : Threonin : Glykokoll : Asparaginsäure wie die Zahlen 750 : 695 : 635 : 537 : 330 : 180.

Aus den vorstehend mitgeteilten Versuchen folgt: 1. Daß die nach der Chromatographie in den getrennten Zonen zu bestimmenden Aminosäurenmengen nur Prozentsätze der im Gemisch vorhanden gewesenen betragen. 2. Daß diese Prozentsätze nicht nur von den Trennungsflüssigkeiten beeinflußt werden, sondern auch — unter sonst gleichen Arbeitsbedingungen — von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Aminosäurenmischung. Um zuverlässige Bezugswerte zu erhalten, ist es daher notwendig, Mischungen bekannter Zusammensetzung mit zu chromatographieren; diese sind der Analysenmischung möglichst anzugleichen. 3. Daß zur Behandlung der Chromatogramme bis zur Bildung des Kupferkomplexes der Ninhydrinfärbungen und zur Bestimmung der Extinktionen der roten Lösungen bestimmte Arbeitsbedingungen genau einzuhalten sind. Nur die Werte von Farbstreifen, die auf dem gleichen Papierbogen erhalten wurden, können aufeinander bezogen werden. Die Aufstellung von ein für alle Male verwendbaren „Eichkurven" ist daher nicht möglich.

Die Analyse einer Aminosäurenmischung.

Für die Ausführung einer quantitativen Analyse eines Proteinhydrolysats oder einer sonstigen Aminosäurenmischung unbekannter Zusammensetzung empfiehlt sich aus den dargelegten Gründen folgender Arbeitsgang: Man führt zunächst durch zweidimensionale Chromatographie den qualitativen Nachweis der vorhandenen Aminosäuren aus, wobei gleichzeitig eine Schätzung ihrer Mengenverhältnisse möglich wird. Prolin, Tryptophan und Histidin werden durch besondere Verfahren nachgewiesen und bestimmt (siehe S. 546 und S. 559). Bei der anschließenden eindimensionalen Chromatographie mit gepufferten Verteilungs-

medien läßt man eine Bezugslösung mitwandern, welche die nachgewiesenen Aminosäuren in den geschätzten Mengenverhältnissen enthält (Voranalyse). Wenn nicht exzeptionelle Mengenverhältnisse in der Analysenlösung sind oder Überraschungen auftreten, etwa durch den Nachweis einer bisher unerkannten Komponente, dann können die Ergebnisse dieser Voranalyse schon recht befriedigend sein (siehe Tab. 6). In keinem Falle werden die gefundenen Werte um mehr als 15% von den tatsächlichen abweichen. Durch Wiederholung der eindimensionalen Chromatographie des Hydrolysats, diesmal gemeinsam mit einer Bezugslösung, die nach den Ergebnissen der Voranalyse gemischt worden ist, erhält man die endgültigen Werte.

Selbstverständlich vereinfacht sich der Arbeitsgang, wenn die Zusammensetzung des zu analysierenden Proteins schon annähernd bekannt ist (z. B. wenn Proteine von ähnlicher Zusammensetzung untersucht werden) oder wenn ungefähre Werte genügen.

Da Proteinpräparate genau ermittelter Zusammensetzung noch nicht international erhältlich sind, wurde zur Prüfung der Leistungsfähigkeit des ausgearbeiteten Verfahrens eine Mischung aus 16 Aminosäuren analysiert.

Tabelle 6. *Abhängigkeit der prozentualen Fehler der Voranalyse von den Abweichungen der A. S.-Konzentration (c) in Vergleichslösung*[1] *(V) und Analysenlösung*[2] *(A).*

Analysengemisch von 16 A. S.; davon chromatographisch bestimmt:	Proz. Abweichung der c in V von der in A	Proz. Fehler der Voranalyse
I Asparaginsäure	+ 1,3	+ 3,5
Glutaminsäure	— 70,2	—13,7
Serin	+ 74,0	+ 4,85
Glykokoll	— 57,8	— 8,7
Threonin	+ 47,4	+ 2,5
Alanin	+126,0	+ 9,8
II Tyrosin	+ 18,3	+ 3,4
Valin	— 46,8	— 3,65
III Lysin . 2 HCl	+162,0	+ 4,9
Arginin	+ 28,6	+ 2,0
IV Isoleucin	+ 14,1	— 7,6
Leucin	+ 67,8	— 8,2

[1] Vergleichslösung durch Auffüllen des A. S.-Gemisches (pro Säure etwa $2 \cdot 10^{-4}$ Mol) auf 25 cm³.

[2] Analysenlösung wie in Tab. 7, Spalte 3, angegeben. I Mit Phenol p_H 12 absteigend 24 Std bei 20° entwickelt. II Mit Phenol p_H 1 entwickelt, 24 Std, 20°. III Mit Lutidin p_H 6,2 entwickelt, 40 Std, 20°. IV Mit n-Butanol-Benzylalkohol p_H 8,4 entwickelt, 40 Std, 20°. Auftragen der Lösungen, Weiterbehandlung und Bestimmung wie im experimentellen Teil angegeben. In Spalte 3 angegeben sind die Durchschnittswerte aus je 8 Einzelbestimmungen.

Um jede Beeinflussung des Experimentators auszuschließen, wurde die Aminosäurenmischung vom Älteren von uns eingewogen. Der Jüngere führte die Analyse allein und selbständig in etwa 14 Werktagen aus

Tabelle 7. *Ergebnisse der Analyse eines Gemisches aus 16 Aminosäuren.*

Aminosäure	Trennungsmedium	Eingewogen		Gefunden		Fehler		Zahl der Einzelbest.	Im Vergleichsgemisch	
		mg	g A. S. in 100 g A. S.-Gemisch	mg	g A. S. in 100 g A. S.-Gemisch	abs.	%		mg	Proz. Abweich. v. d. Einwaage
Asp.säure	Phen. p_H 12	31,3	5,58	31,4	5,59	+0,1	+0,3	14	32,3	+ 3,2
Glutam.s.	Phen. p_H 12	117,8	20,97	116,0	20,65	—1,8	—1,5	14	106,0	—10,0
Serin . .	Phen. p_H 12	16,5	2,94	16,8	2,99	+0,3	+1,8	14	18,6	+12,7
Glykokoll	Phen. p_H 12	39,1	6,96	39,2	6,98	+0,1	+0,3	14	29,5	—24,5
Threonin .	Phen. p_H 12	19,9	3,54	20,3	3,61	+0,4	+2,0	14	26,4	+32,7
Alanin . .	Phen. p_H 12	9,2	1,64	9,4	1,67	+0,2	+2,2	14	10,3	+12,0
	Phen. p_H 1			(8,75	1,56	—0,45	—4,9)	8		
Tyrosin .	Phen. p_H 12	86,4	15,38	86,7	15,43	+0,3	+0,35	8	91,7	+ 6,1
	Phen. p_H 1			(84,75	15,08	—1,65	—1,9)	8		
Valin . .	Phen. p_H 1	54,8	9,76	52,9	9,42	—1,9	—3,5	8	52,9	— 3,5
Lys. .2HCl	Lut. p_H 6,2	21,4	2,55	21,6	2,56	+0,2	+0,9	8	24,2	+13,1
Arginin .	Lut. p_H 6,2	29,7	5,29	29,8	5,31	+0,1	+0,3	8	30,2	+ 1,7
Isoleucin .	Benzylalkoh.									
	But. p_H 8,4	23,7	4,22	23,85	4,25	+0,15	+0,6	8	21,9	— 7,6
Leucin . .	Benzylalkoh.									
	But. p_H 8,4	15,8	2,81	15,7	2,80	—0,1	—0,6	8	14,8	— 6,3
Phenyl-	o-Kresol									
alanin. .	p_H 6,2 tert. But.-	25,2	4,49	24,6	4,38	—0,6	—2,4	6	28,0	+11,1
Prolin . .	Meth.-äth.-									
	Ket.-Wasser	26,4	4,70	25,0	4,45	—1,4	—5,3	8	25,6	— 3,0
Tryptoph.	U.V.-Abspt.	11,1	1,98	10,9	1,94	—0,2	—1,8	1	8,9	—19,8
Histidin .	colorimetr. .	49,7	7,16	49,0	7,09	—0,7	—1,4	3	40,0	—19,5
Summe .		578,0		573,15		—4,85	—0,84		561,3	

Die Streuung der einzelnen Bestimmungen in Prozenten.

Aminosäure . . .	Asp.	Glut.	Ser.	Glyk.	Thr.	Al.	Tyr.
Maxim. Streuung	10,5	5,41	6,41	12,4	5,57	5,38	2,85
Mittelwert der Streuung .	4,7	1,93	2,54	4,6	3,10	2,42	2,11

Aminosäure . . .	Val.	Lys.	Arg.	Isol.	Leuc.	Ph.al.	Prol.
Maxim. Streuung .	0,9	4,25	1,4	8,25	5,46	15,5	8,2
Mittelwert der Streuung .	0,6	2,35	0,7	6,60	3,58	10,2	4,7

Bestimmungen von Aminosäuren nach dem angegebenen Verfahren, jedoch *ohne* chromatographische Trennung, haben mittlere Streuungen (für Extinktionen von 0,3 aufwärts) von nur 0,5—1%, maximale Streuungen von 1—3%.

und erfuhr die Einwaagen erst, als er seine Arbeit vollendet und die gefundenen Werte ausgerechnet und mitgeteilt hatte.

Die Werte von Tab. 6 zeigen in Kürze wie groß die prozentualen Fehler der Voranalyse bei den 12 chromatographisch getrennten Säuren sind, wenn die (nach Schätzung gemischte) Vergleichslösung noch stark von der Analysenlösung abweicht. Die Werte geben eine Bestätigung der Notwendigkeit, beide Lösungen einander anzugleichen. Die Vorzeichen der prozentualen Abweichungen der Vergleichslösung sind die gleichen, wie jene der Fehler. Eine Ausnahme macht nur das Paar Leucin-Isoleucin, die Schmerzenskinder jeder Trennung.

Aus den Angaben von Tab. 7 geht hervor, daß nach Angleichung der Bezugslösung an die Analysenlösung mit Hilfe der in der Voranalyse ermittelten Werte[1] die prozentualen Fehler klein werden. Genauere Ergebnisse werden durch Papierchromatographie vermutlich erst zu erhalten sein, wenn es gelingt, mehrere der prinzipiellen Fehlerquellen, vor allem bei der Ninhydrinreaktion, weiter zu verkleinern.

Die 4. Spalte (Proz. Zusammensetzung) von Tab. 7 zeigt die Schwierigkeiten der ausgeführten Analyse: Glutaminsäure und Tyrosin waren sehr stark vertreten, Serin, Leucin, Lysin, Tryptophan und Alanin schwach.

Die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren waren ausgelassen worden. Nach unseren Erfahrungen hätte die Bestimmung von Methionin keine Schwierigkeiten bereitet. Auch Cystin hätte sich genau ermitteln lassen, würde aber die Bestimmung von Lysin, Arginin und Serin aus den auf S. 550 angegebenen Gründen erschwert haben.

Methodische Angaben.

Die Hydrolyse.

Die zu analysierenden Proteinpräparate sind bei 60° im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz zu trocknen. Ihr Stickstoffgehalt wird durch mindestens 2 Elementaranalysen ermittelt. 5—10 mg Substanz werden auf der Mikrowaage in ein Glasröhrchen von etwa 7 mm Durchmesser eingewogen und mit 1 cm³ reiner, redestillierter 6 n Salzsäure versetzt. Wenn auch Cystin und Tyrosin bestimmt werden sollen, verwendet man besser 1 cm³ eines Gemisches aus gleichen Volumteilen 6 n Salzsäure und 90%iger Ameisensäure. Nach dem Verdrängen der Luft durch Stickstoff wird das beschickte Röhrchen zugeschmolzen und 22—24 Std in siedendem Wasser erhitzt. Das Hydrolysat wird dann quantitativ in ein 5 cm³-Kölbchen übergeführt und im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd und Phosphorpentoxyd zur Trockene gebracht. Zur Vermeidung von Verlusten kühlt man zweckmäßig die Flüssigkeit auf 0° und evakuiert dann bis 14—16 Torr. Der Rückstand wird noch 2mal mit je 0,5 cm³ Wasser versetzt und wieder eingetrocknet. Schließlich neutralisiert man die restliche Salzsäure mit 2—5 Tropfen 0,5 n Natronlauge bis p_H 6,0 (Störungen der Chromatographie durch den geringen Salzgehalt wurden nie beobachtet). Falls viel Cystin oder Tyrosin vorhanden sind, wird die Neutralisation unterlassen, damit die Aminosäuren vollständig in Lösung

[1] Nur die Glykokoll- und Threoninmengen waren infolge eines Versehens schlecht angeglichen worden.

gehen. Nach nochmaligem scharfen Eintrocknen wird das Hydrolysat in genau 1 cm³ destilliertem Wasser gelöst. Die Genauigkeit der Pipette ist durch eine Wägung zu überprüfen. Ebenso ist es zweckmäßig, die zugegebene Wassermenge durch Wägung nachzuprüfen. Die Analysenlösung wird mit einem kleinen Tropfen Toluol versetzt und dicht verschlossen bei 0° aufbewahrt. Von Lösungen des Hydrolysats in 10%igem Isopropanol kamen wir ab, weil die niedrigere Oberflächenspannung die Mikropipettierungen erschwert.

Soll eine Tryptophanbestimmung auch im Hydrolysat ausgeführt werden, so hydrolysiert man ebenfalls 5—10 mg Protein im stickstoffgefüllten Röhrchen mit 1 cm³ heißgesättigter Bariumhydroxyd-Lösung 24 Std im Ölbad bei 125—130°. Die Fällung der Barium-Ionen wird im Zentrifugenglas durch Zugabe von Schwefelsäure bis p_H 6,0 ausgeführt. Der Niederschlag wird 2mal mit je 1 cm³ heißem, essigsäurehaltigem Wasser ausgezogen. Lösung und Waschwässer werden gemeinsam scharf eingetrocknet und in genau 1 cm³ Wasser aufgenommen.

Die derart dargestellten Hydrolysatlösungen sind 0,5—1,0%ig; für die Trennungen sind 10—60 mm³ auf das Papier aufzutragen. Das sind zum Teil unbequem große Mengen; doch geht es auf Kosten der Genauigkeit, wenn weniger als 1 cm³ Lösung hergestellt wird. Wenn mehr Protein zur Verfügung steht, ist es selbstverständlich besser, durch höhere Einwaagen 5 oder 10 cm³ Lösung herzustellen und diese 2%ig zu machen.

Bei Verwendung von 1 cm³-Hydrolysaten wurde nach dem Verbrauch von zwei Dritteln häufig ein Ansteigen der Werte beobachtet, wahrscheinlich als Folge der Verdunstung der kleinen Flüssigkeitsmenge bei den wiederholten Entnahmen.

Nach der Hydrolyse kleiner Eiweißmengen (5—10 mg) muß man eine bestimmte Wassermenge (1 cm³) zugeben, da Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen ungenauer wäre. Daher soll auch die Lösung des Aminosäuren-Vergleichsgemisches mit einem bestimmten Wasservolumen erfolgen. Der durch einen geringen Salzgehalt des Hydrolysats entstehende Volumunterschied kann einen Fehler von höchstens 0,1—0,2% verursachen, liegt also innerhab der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode. Würde die Vergleichslösung *durch Auffüllen* z. B. 1% gemacht werden, dann würde der Fehler etwa 0,5% betragen (Volumkontraktion).

Die bei der Proteinhydrolyse stattfindende partielle Zersetzung von Tryptophan, Threonin, Serin, Cystin und anderen Aminosäuren ist bekanntlich unter verschiedenen Bedingungen vielfach untersucht worden. Ohne hier auf eine Diskussion dieser Fragen eingehen zu wollen, sei bemerkt, daß eine Korrektur der im Hydrolysat papierchromatographisch ermittelten Werte nur gerechtfertigt erscheint, wenn Bestimmungen des Zersetzungsprozentsatzes der betreffenden Aminosäure genau unter den angewandten Hydrolysenbedingungen vorliegen, obwohl es noch unsicher bleibt, ob diese Säure sich in freiem Zustand gleich verhält wie bei der Loslösung aus dem Protein und in Gegenwart von Begleitstoffen. Wir ermittelten, daß z. B. Threonin zu 2,6%, Serin zu 8,3% zerstört wird, wenn diese Aminosäure zu je $2 \cdot 10^{-4}$ Mol in 5 cm³ 6 n Salzsäure 24 Std bei 100° erhitzt werden. Arginin und Lysin erleiden, wie wir nachprüften, bei gleicher Behandlung keine meßbare Zersetzung.

Die Vergleichslösungen.

Die Reinheit der zum quantitativen Vergleich dienenden Aminosäuren ist genau zu prüfen, da durchaus nicht alle käuflichen Markenpräparate sie in genügendem Grade haben. Wir fanden z. B. L-Leucin zuweilen bis zu 12% mit anderen Aminosäuren verunreinigt; ein L-Alaninpräparat enthielt 6,6% Glykokoll. Die als Eichsubstanzen dienenden Aminosäuren sind daher quantitativ zu untersuchen: 1. Auf Richtigkeit des Stickstoffwertes (bis 0,2%). 2. Auf Abwesenheit von Asche und Ammoniumsalzen. 3. Auf Einheitlichkeit in den Versuchen der papierchromato-

graphischen Trennung (höchstens 0,5% Beimengungen). Weiterhin ist zu prüfen, ob sie bei 60° im Hochvakuum gewichtskonstant bleiben.

Zur Herstellung der Vergleichslösung werden, je nach dem (aus der zweidimensionalen Trennung oder aus anderen Gründen) vermuteten Prozentsatz der Aminosäuren im Hydrolysat, 1 bis 3×10^{-4} Mol der einzelnen Aminosäure mit der Mikrowaage gewogen, das Gesamtgemisch in genau 25 cm³ Wasser gelöst und nach Zugabe von 1 Tropfen Toluol bei 0° aufbewahrt. Nach Ausführung der Vorbestimmung werden für die Vergleichslösung der endgültigen Bestimmung die Aminosäuren möglichst genau nach dem erwarteten Verhältnis eingewogen.

Die zweidimensionale Chromatographie zum qualitativen Nachweis.

Es wird aufsteigend chromatographiert, auf $^1/_4$ Bogen WHATMAN-Papier Nr. 1, die 30 × 25 cm zugeschnitten sind. Als Gefäße dienen 5 l-Einmachgläser von 26 cm Höhe, die mit Cellophanfolie und einem Gummiring verschlossen werden. 80 bis 100 γ Hydrolysat, entsprechend 8—10 mm³ 1%ige Lösung, werden mit der Mikropipette 3 cm diagonal von einer Ecke entfernt punktförmig aufgetragen. Um einen kleinen, scharfrandigen Fleck zu erzeugen, läßt man jeweils nur 1 mm³ aus der Pipette fließen und trocknet dazwischen mit einem warmen Luftstrom („Föhn") auf. Zur sicheren Identifizierung einzelner Aminosäuren kann man Kontrollen mitlaufen lassen, die jedoch nicht in die Verteilungsfläche des Hydrolysats geraten dürfen. Sie sind am anderen Ende der Startlinie anzubringen und nur vom ersten Lösungsmittel verteilen zu lassen. Es genügen 2 bis 4.10^{-8} Mol pro Komponente; das entspricht 2—4 mm³ Testlösung. Meistens ist übrigens die gegenseitige Stellung der Aminosäuren bei einiger Erfahrung nicht zu verwechseln. In Zweifelsfällen kann man auch zweidimensionale Verteilungen mit einem synthetischen Gemisch als Modellversuch ausführen und dabei systematisch fragliche Aminosäuren weglassen oder hinzufügen. Das Papierstück wird zu einem 25 cm hohen Zylinder gerollt und mit rostfreien Briefklammern so zusammengehalten, daß sich die Ränder nicht berühren. Falls Essigsäure oder Phenol im Lösungsmittelgemisch enthalten ist, empfiehlt es sich, einen Zwirnsfaden so durch die Papierränder zu ziehen, daß sie ohne zu überlappen in etwa 5 mm Abstand gehalten werden. Nun wird die Papierrolle in das Glas gestellt, dessen Boden mit 150—200 cm³ Lösungsmittel bedeckt ist. Der Hydrolysatfleck darf nicht eintauchen. Sobald das erste Lösungsmittel den oberen Rand des Papiers beinahe erreicht hat, unterbricht man den Versuch, trocknet das Blatt im Luftstrom, schneidet es auf 25 × 25 cm zu, rollt es senkrecht zur ersten Richtung und stellt es in das Glas mit der zweiten Verteilungsflüssigkeit ein.

Als Lösungsmittel wurden zur Verteilung der „nichtpolaren" Aminosäuren (Threonin, Alanin, Prolin, Tyrosin, Valin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin) die von R. A. BOISSONNAS angegebenen [3] verwendet, d. h. in der ersten Dimension tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser im Volumenverhältnis 2:2:1, in der zweiten tert. Butanol-Methanol-Wasser 4:5:1. Zur Verteilung der „polaren" Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Serin, Glykokoll, Lysin, Arginin) verwendeten wir in der ersten Dimension gepuffertes Phenol vom p_H 12,0 (siehe unten), in der zweiten n-Butanol-Eisessig-Wasser im Volumenverhältnis 4:1:5 (die Flüssigkeiten werden in diesem Verhältnis im Scheidetrichter geschüttelt; die leichtere Phase wird verwendet. Da sich nach einigen Tagen Estergeruch bemerkbar macht, soll nur frisch bereitetes Gemisch gebraucht werden). Da die Papierbogen beim Einstellen in das Gefäß nicht wassergesättigt sind und bei dieser einfachen Versuchsanordnung die wäßrige Phase fehlt, verarmen die Lösungsmittelgemische an Wasser. Daher wandert zum Beispiel das gepufferte Phenol bei mehrfacher Verwendung immer langsamer, da seine Viscosität zunimmt. Es empfiehlt sich daher für jeden Ansatz die Verwendung von frischem Lösungsmittel.

Während der Verteilungsversuche stehen die abgeschlossenen Gläser im temperaturkonstantem Raum bei 20°. Das tert. Butanol-Methyläthylketon-Wassergemisch und das gepufferte Phenol steigen in etwa 15 Std 25 cm hoch; die Lösungsmittel tert. Butanol-Methanol-Wasser und n-Butanol-Essigsäure-Wasser brauchen zu dieser Strecke nur 5—6 Std. Mit gepuffertem Phenol vom p_H 12,0 lassen sich übrigens bessere Trennungen erzielen, wenn 20 Std auf einem halben Papierbogen absteigend entwickelt wird; in der zweiten Dimension genügt die aufsteigende Verteilung mit n-Butanol-Essigsäure-Wasser.

Die eindimensionalen, quantitativen Trennungen.

Auch bei der absteigenden, eindimensionalen Chromatographie wurde Whatman-Papier Nr. 1 verwendet. Das Lösungsmittel wurde senkrecht zur Faserrichtung wandern gelassen. Diese ist auf dem Papier nicht vermerkt, kann aber leicht durch Aufbringen eines Wassertropfens festgestellt werden: Der Tropfen läuft zu einem elliptischen Fleck auseinander, dessen längere Achse die Faserrichtung anzeigt.

Bei Chromatogrammen auf halben Papierbogen wurden als Gefäß Batteriegläser 50 × 30 × 20 cm verwendet, bei solchen auf ganzen Bogen Glaskästen 60 × 60 × 20 cm. Diese wurden mit einer Talkum-Wasserglas-Mischung gekittet, die auch zur Anfertigung der Tröge aus Glasstreifen diente. An die Schmalseiten der Batteriegläser wurden 40 cm hohe Glasstreifen gekittet, als Auflagen für die Brücke, welche den Lösungsmitteltrog und die Halterung für die Führungsglasstäbe trägt. Die inneren Seitenwände der Kammern sind mit Filtrierpapier beklebt, damit das Wasser oder die lösungsmittelgesättigte Pufferflüssigkeit, die den Boden bedeckt, darin hoch steigt und die Atmosphäre des Kastens schnell mit ihrem Dampf sättigt. Es ist wichtig, daß besonders die leichter flüchtigen Komponenten eines Gemisches in größeren Mengen im Gefäß vorhanden sind.

Die Gefäße sind mit einer Glasplatte abgedeckt, die auf Streifen aus Schaumgummi dicht aufliegt. Diese Platte ist mit einer verstöpselten Bohrung versehen, damit man nach dem Einhängen des Papierbogens in die Kammer die Sättigung mit Wasserdampf abwarten und dann erst durch einen Trichter bei geschlossenem Kasten die Verteilungsflüssigkeit in den Trog füllen kann.

Die gepufferten Verteilungsmedien werden nach den Angaben von McFarren hergestellt [5]. Durch Destillation gewinnt man farblose Präparate von Lutidin, Phenol und o-Kresol und schützt die Phenole durch Zugabe von wenigen mg Natriumcyanid vor erneuter Verfärbung. Die Sättigung mit den wäßrigen Pufferlösungen geschieht durch Schütteln etwa gleicher Volumteile beider Phasen bei der gleichen Temperatur, die beim Verteilungsversuch selbst herrscht.

Pufferlösung von p_H 1,0: 50 cm³ 0,2 m KCl + 97,0 cm³ 0,2 m HCl
Pufferlösung von p_H 6,2: 80 cm³ 0,067 m KH_2PO_4 + 20 cm³ 0,067 m Na_2HPO_4
Pufferlösung von p_H 8,4: 50 cm³ 0,067 m Borsäure und
KCl + 8,55 cm³ 0,067 m NaOH.
Pufferlösung von p_H 12,0: 50 cm³ 0,067 m Na_2HPO_4 + 50 cm³ 0,067 m NaOH

Phenol vom p_H 1 dient zur Trennung von Cystin, Alanin, Tyrosin, Valin, Methionin (geordnet nach steigenden R_f-Werten); Phenol vom p_H 12 zur Trennung von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Glykokoll, Threonin, Alanin, Tyrosin; o-Kresol vom p_H 6,2 zur Abtrennung von Phenylalanin; Lutidin vom p_H 6,2 zur Trennung von Lysin und Arginin (reines Lutidin wird mit 0,022 m Pufferlösung vom p_H 6,2 gesättigt, d. h. mit der oben angegebenen nach Verdünnung auf das 3fache Volumen). Zur Trennung von Leucin und Isoleucin dient ein auf p_H 8,4 gepuffertes Gemisch aus n-Butanol und Benzylalkohol in Volumverhältnis 1:1 (McFarren [5]). Die Mischung aus tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser 2:2:1 (nach Boissonnas [3]) eignet sich noch besser um, außer Valin und Methionin, auch

Leucin und Isoleucin voneinander zu trennen; doch ist sie nur in Abwesenheit von Phenylalanin zu empfehlen, da sie diese Säure mit Isoleucin wandern läßt.

Für die Kästen 60 × 60 × 20 cm schneidet man WHATMAN-Papierbogen 60 × 53 cm zurecht, für die Batteriegläser halbe Bogen. Die Faserrichtung soll parallel zur kürzeren Seite, also senkrecht zur Verteilungsrichtung, laufen. Es können sonst beim Tränken der Bogen mit Pufferlösung Knicke oder Risse entstehen und beim Trocknen stärkere Verziehungen. An einer kürzeren Seite wird der Rand 2 cm umgeschlagen und ein dünner, 56 cm langer Glasstab mit Polyvinylklebstoff eingeklebt. Dieser dient als Aufhängevorrichtung beim Trocknen und als Beschwerung, damit der Bogen während der Verteilung im Kasten glatt herunterhängt. Ebenfalls senkrecht zur Längsachse und 8 cm vom gegenüberliegenden Papierrand falzt man den Bogen ein; an diesem Knick hängt er über dem Führungsglasstab. Das kurze Ende des Bogens reicht in den Lösungsmitteltrog hinein und wird dort durch einen aufgelegten Glasstab festgehalten, das lange Ende mit dem eingeklebten Stab hängt frei in das Gefäß hinunter.

Von den gepufferten Verteilungsmedien stellt man sich zweckmäßig etwa 1 L auf einmal her und gießt die wäßrige Phase in den Kasten. Die vorbereiteten Papierbogen werden vorsichtig durch die Pufferlösung gezogen (die sich in einem flachen Trog befindet) und anschließend im Luftstrom von 35° (siehe unten) getrocknet. Dann werden das zu analysierende Hydrolysat und die Vergleichslösung (in den weiter unten geschilderten, gestaffelten Konzentrationen) auf die Startlinie des Papierbogens gebracht, die in etwa 3 cm Abstand vom Falz für den Führungsstab läuft.

Es werden je 100—400 γ Hydrolysat, entsprechend 10—40 mm³ 1%iger Lösung, auf 4 cm Startlinie gebracht; in gleicher Weise wird die Vergleichslösung aufgetragen.

Die 4 cm-Striche der Analysenlösung und Vergleichslösung sind auf abwechselnde Plätze aufzutragen, um möglichst räumlich nahe Vergleichspaare zu erhalten. Da zwischen diesen Aminosäurenstrichen 2 cm Abstand gelassen werden, in der Mitte des Bogens 4 cm Abstand, weil dort das Papier vor dem Anfärben auseinander geschnitten wird, können 4 Analysenproben und 4 Vergleichsproben gleichzeitig auf einem Bogen chromatographiert werden. Zur Abmessung der Lösungen wurde eine 10 mm³-Mikropipette verwendet mit einem Ablesefehler < als 1%. Bringt man diese Lösungen als Strich in einem Zuge auf die 4 cm-Startlinie, so fließen sie schnell aus der Pipette und werden ungleichmäßig und breit verteilt. Zur gleichmäßigen Verteilung auf einem schmalen Strich ist es besser, Tröpfchen von je 0,5 mm³ in etwa 4 mm Abstand nebeneinander auf die Startlinie zu bringen und nach Auftragung von 5mm³ das Papier immer wieder mit Warmluft („Föhn") zu trocknen. In einem 60 × 60 × 20 cm-Kasten lassen sich 2 Bogen gleichzeitig entwickeln. Nach ihrem Einhängen in das Gefäß (das am Boden schon die wäßrige Phase enthält, aber einen noch leeren, sauberen Trog) und dem Auflegen der Deckplatte wartet man noch 2—3 Std die Sättigung des Papiers mit Wasserdampf ab, bis man durch die Bohrung der Deckplatte den Trog mit der Verteilungsflüssigkeit (150—200 cm³) beschickt. Die Kästen stehen im temperaturkonstanten Raum. Bei 20° braucht Phenol als bewegliche Phase etwa 24 Std, um den Papierbogen in seiner ganzen Länge zu durchwandern; Lutidin und o-Kresol benötigen etwa 35 Std. Die Gemische tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser und n-Butanol-Benzylalkohol brauchen zum Absteigen etwa 24 Std, werden jedoch 40 Std einwirken gelassen, denn auf diese Weise werden Leucin und Isoleucin etwa 25 cm weit transportiert und besser getrennt. Das überschüssige Lösungsmittel tropft am unteren Papierrand ab, der mit kleinen Zacken zu versehen ist. Bei diesen Durchlaufchromatogrammen näht man zweckmäßigerweise den Glasstab zur Beschwerung und späteren Halterung nahe dem unteren Rande mit einigen Stichen fest.

Zur Abtrennung des Phenylalanins mittels o-Kresol genügen 24 Std Laufzeit durchaus.

Nach vollendeter Chromatographie werden die Papierbogen zur schonenden *Entfernung des Lösungsmittels* im Luftstrom bei 35° getrocknet. Man verwendet dazu einen Ventilator, der die Luft durch ein Heizgitter (von 1250 Watt) hindurch gleichmäßig auf den Papierbogen bläst. Für Phenol genügen 1,5 Std, für Lutidin 1 Std, für o-Kresol 2 Std, für tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser 0,5 Std, für Benzylalkohol-Butanol 2 Std. Die möglichst gleichmäßige und vollständige Entfernung der Lösungsmittel ist für den folgenden Vorgang wichtig.

Zur *Erzeugung der Färbungen durch die Reaktion mit Ninhydrin* wurde eine 0,5%ige Lösung von Ninhydrin in einer Mischung von 93 Volumina wassergesättigtem n-Butanol und 7 Volumina Eisessig verwendet. Nur bei den sauren Phenol-Chromatogrammen nimmt man als Lösungsmittel für das Ninhydrin n-Butanol, welches mit einer Pufferlösung aus gleichen Teilen 2 n Essigsäure und 1 n Natronlauge gesättigt ist. Die getrockneten Chromatogramme werden, falls sie ganze Bogen sind, zur besseren Handhabung in der Laufrichtung halbiert, dann durch die Ninhydrinlösung gezogen, und zwar entgegengesetzt der Laufrichtung des Lösungsmittels. Anschließend sind die Papierstreifen sofort in einem möglichst ammoniakfreien Luftstrom von 35° (Ventilator) zu trocknen.

Zur Aufnahme der Ninhydrinlösung dient zweckmäßig ein flacher Trog, den man sich aus einer Glasplatte 30 × 7 cm und 8 mm dicken Glasstäben als Umrandung zusammenkittet. Er wird in der Querrichtung leicht schräg gestellt und nur mit so viel Reagens auf einmal angefüllt, daß beim Durchziehen der Papierstreifen die Lösung nicht über den Chromatogrammen zusammenschlägt, sondern sie nur von unten her durchtränkt. Das Papier gleitet ohne zu knicken und zu falten über die runden Ränder. Bei dieser Arbeitsweise tritt kein Verlaufen der Aminosäurenflekken ein.

Nach 20 min entfernt man die Chromatogramme (auf denen die Farbflecken schon schwach sichtbar werden) aus dem Luftstrom und hält sie zur Farbentwicklung genau 20 min bei genau 60° im Trockenschrank.

Besonders kräftig treten (bei gleicher Konzentration) die blauvioletten Flecken von Alanin, Glutaminsäure und Lysin hervor; Asparaginsäure liefert die schwächsten; Prolin bekanntlich nur gelbe, leicht zu übersehende Färbungen; Phenylalanin fast rein blaue; Glykokoll und Tyrosin zum bräunlich neigende. Nach Entwicklung mit Lutidin wird der Farbton bei allen Aminosäuren ins Blaue verschoben. Die entwickelten Farbflecken werden mit Bleistift numeriert, um Verwechslungen zu vermeiden. Bei schwer zu trennenden Aminosäurenpaaren, wie Leucin-Isoleucin, zeichnet man sehr sorgfältig quer zur Laufrichtung Trennungslinien, welche die Orte minimaler Färbung zwischen den Flecken verbinden. Das Chromatogramm wird dann entlang dieser Linien, quer zur Verteilungsrichtung, in Streifen geschnitten, so daß stets 4 Flecken der gleichen Aminosäure auf einem zusammenhängenden Stück Papier sind. Diese Streifen werden auf einen zugespitzten, rostfreien, starren Stahldraht aufgefädelt und so aufgehängt, um mit der Kupfersalzlösung besprüht zu werden. Farbenentwicklung und Überführung in das Kupfersalz sollen unmittelbar aufeinander folgen; starke Belichtung der Papierstreifen ist unterdessen zu vermeiden.

Das *Reagens zur Bildung des Kupfersalzes* haben wir doppelt so konzentriert angewandt, als von Th. Wieland und E. Kawerau angegeben [13]. Die Mischung aus 2 cm³ gesättigter, wäßriger Kupfernitratlösung, 0,2 cm³ 10%iger Salpetersäure und 100 cm³ 96%igem Äthanol wird mit Hilfe eines Glaszerstäubers durch Stickstoff aus der Druckflasche von beiden Seiten auf die Papierstreifen gesprüht. Zweckmäßigerweise hängen diese im Luftstrom eines Ventilators, so daß der Alkohol sofort verdunstet. Die Flecken sollen durch und durch rot werden und keine blau-

stichigen Stellen zeigen. Dichtere Ansammlungen des Kupferkomplexes können gelbrot aussehen.

Nun werden die Farbflecken einzeln ausgeschnitten und zwar so, daß die Papierstücke ein und derselben Aminosäure möglichst flächengleich sind. Die einzelnen Papierstücke werden, wenn nötig gefaltet oder entzweigeschnitten, in Reagensgläser gebracht und mit genau 5 cm³ Methanol puriss. übergossen. Man verschließt mit guten Korkstopfen und schüttelt einige Male um. Eine viertel bis eine halbe Stunde danach mißt man die Extinktion der Lösungen mit dem BECKMAN-Spektrophotometer bei 504 mμ in der 1 cm-Küvette. Die Flüssigkeitsmenge reicht bequem zur Messung und zum Ausspülen der Küvette. Als Kompensationsflüssigkeit dient reines Methanol. Es ist darauf zu achten, daß auf den Papierstücken keine Farbflecken bleiben; sonst hat eine unvollständige Bildung des Kupferkomplexes stattgefunden.

Die Berechnung der Konzentrationen aus den gemessenen Extinktionen.

Das Mengenverhältnis der Aminosäuren in der Vergleichslösung. Die Werte der Vorbestimmung werden im äußersten Falle um 15% von den tatsächlichen Werten abweichen, so daß die Konzentration der Aminosäuren in der Vergleichslösung für die endgültige Bestimmung auf 15% und weniger an die Konzentration der Aminosäuren im Hydrolysat angeglichen werden kann. Im Falle eines „1%igen" Hydrolysats (10 mg Protein hydrolysiert, in 1 cm³ Wasser gelöst) wird man zur bequemeren Handhabung das 25—50fache Gewicht der Aminosäuren, welche in 10 mg Protein enthalten sind, einwiegen und das Gemisch in der 25—50fachen Menge, also in 25—50 cm³ lösen. Bei „0,5%igen" Hydrolysaten (5 mg Protein hydrolysiert und in 1 cm³ Wasser gelöst) empfiehlt es sich, die Vergleichslösung doppelt so konzentriert zu machen wie das Hydrolysat.

Die auf das Papier zu bringenden Lösungsmengen. Grundsätzlich werden bekannte und unbekannte Lösung in abwechselnder Reihenfolge aufgetragen (siehe Abb. 1, S. 546). Die Durchnumerierung der Startplätze erfolgt z. B. mit 1,1′, 2,2′, 3,3′, 4,4′ und zeigt an, daß die Trennungen paarweise zusammengehören (die gestrichenen Zahlen sollen z. B. die Startplätze für die Vergleichslösung angeben).

Da Hydrolysat und Vergleichslösung die Aminosäuren in etwa gleicher Konzentration enthalten — bis auf die erwähnten 15% Differenz —, trägt man auf jedes Platzpaar gleich viel Kubikmillimeter auf. Es ist zur graphischen Ermittlung des Leerwertes notwendig, nicht 4mal gleiche Mengen von Hydrolysat bzw. Vergleichslösung aufzubringen, sondern eine zweifache Abstufung der Mengen vorzunehmen, etwa im Verhältnis 1:2 bis 3:4. Werden durch ein und dieselbe chromatographische Entwicklung Aminosäuren getrennt, welche in sehr großer bzw. sehr kleiner Konzentration im Hydrolysat vorliegen, so wird man eine 3- oder 4fache Abstufung der Mengen vornehmen müssen, um sowohl bei den stark wie bei den schwach vertretenen Aminosäuren im günstigen Meßbereich der Extinktion bleiben zu können. In solchen Fällen kommt man auch nicht mit 8 Einzelbestimmungen pro Aminosäure aus; man wird 12—16 machen müssen. Es brauchen allerdings nur diejenigen Färbungen ausgewertet zu werden, welche im günstigen Meßbereich liegen.

Unter Einhaltung der in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen wurden in der 1 cm-Küvette Extinktionen von 0,6—0,7 mit folgenden aufgetragenen Aminosäuremengen (in γ) erzielt: Glykokoll 29, Alanin 12, Valin 19, Leucin 16, Isoleucin 30, Phenylalanin 38, Serin 13, Threonin 18, Tyrosin 41, Lysin · 2 HCl 20, Arginin (Base) 21, Asparaginsäure 41, Glutaminsäure 19. Die Zahlen hängen stark ab von den Bedingungen der Entfernung des Lösungsmittels und der Herstellung der Ninhydrinfärbung auf dem Papier und sollen deshalb nur zur ersten Orientierung dienen. Bei schwer zu trennenden Aminosäurepaaren, wie Leucin-Isoleucin, wählt man übrigens die Konzentrationen besser so, daß man mit den Extinktionen im unteren

Teil des günstigen Bereichs, also bei etwa 0,4, bleibt, weil bei höheren Konzentrationen die Trennungen zu unscharf werden.

Die Berechnung der Konzentration. Als Beispiel für das Auftragen der Analysenlösung und für die nachfolgende Auswertung der Messungen sei eine Bestimmung von Arginin und Lysin gewählt. Die Lösungen wurden folgendermaßen auf die 8 Startplätze eines ganzen WHATMAN-Papierbogens verteilt:

Startplatz	1	1′	2	2′	3	3′	4	4′
Menge in mm³	20 H	20 V	20 H	20 V	20 H	20 V	10 H	10 V

Dabei bedeutet *H* Hydrolysat und *V* Vergleichslösung (10 mm³ Vergleichslösung enthielten 12,1 γ Arginin und 9,68 γ Lysin · 2 HCl). Für die beiden Aminosäuren wurden schließlich folgende Extinktionen ($E_{504} \cdot 10^3$) des Kupferkomplexes der Ninhydrinfärbung gemessen:

Farbfleck	1	1′	2	2′	3	3′	4	4′
Arginin	728	734	720	727	724	732	361	372
Lysin · 2 HCl	564	608	548	632	553	607	300	331

Von den gemessenen Extinktionen sind die Leerwerte des Papiers abzuziehen. Sie sind für die meisten Aminosäuren nicht größer als 0,01—0,02. Höhere Leerwerte haben solche Aminosäuren, welche nach der Trennung eine relativ große Papierfläche bedecken, wie z. B. Lysin und Glykokoll. Bei Glykokoll ist die Eichkurve außerdem keine Gerade. Versucht man das Stück dieser Kurve zwischen den Meßpunkten durch eine Gerade zu ersetzen, so werden extrem hohe Leerwerte vorgetäuscht (0,1 und höher) (siehe Abb. 2).

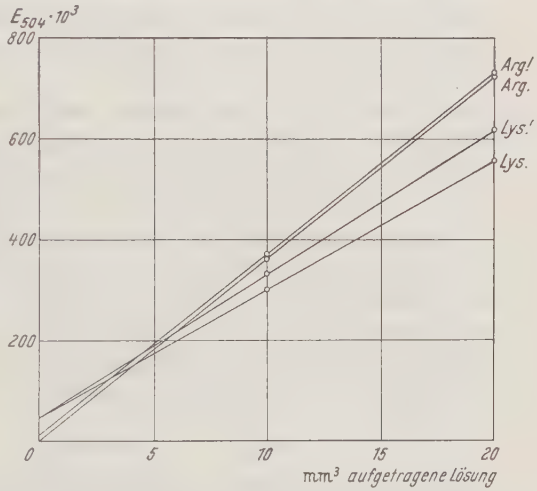

Abb. 3. Ermittlung der Leerwerte.
Arginin: Extinktionen des Arginins in der Analysenlösung.
Arginin′: Extinktionen des Arginins in der Vergleichslösung.
Lysin: Extinktionen des Lysins in der Analysenlösung.
Lysin′: Extinktionen des Lysins in der Vergleichslösung.

Die Bestimmung der Leerwerte wird graphisch vorgenommen: Man trägt die unkorrigierten Extinktionen der Kupferkomplexlösungen von Hydrolysat bzw. Vergleichslösung der betreffenden Aminosäure als Funktion der Anzahl Kubikmillimeter chromatographierter Lösung auf Millimeterpapier und zieht durch die Mittelwerte gleicher Lösungsmengen je eine Gerade (siehe Abb. 3). Die Schnittpunkte der beiden Geraden mit der Ordinate geben die Leerwerte für Hydrolysat bzw. Vergleichslösung der betreffenden Aminosäure an. Der Mittelwert daraus wird von den gemessenen Extinktionswerten abgezogen. In vielen Fällen sind die Leerwerte für ein und dieselbe Aminosäure im Hydrolysat und in der Vergleichslösung gleich. Falls der Leerwert nicht größer als 0,02 ist, braucht er nur bei Extinktionen unter 0,4 berücksichtigt zu werden.

In unserem Beispiel ist der Leerwert für Arginin zu vernachlässigen; diese Aminosäure ist nach der Trennung auf einem schmalen Papierstück lokalisiert. Für

Lysin ergibt sich graphisch ein Leerwert von 0,050, entsprechend der größeren Papierfläche, die es nach der Trennung bedeckt. Für Glykokoll darf die gekrümmte Eichkurve zwischen den Meßpunkten nur dann durch eine Gerade ersetzt werden, wenn die Konzentrationen von Hydrolysat und Vergleich um weniger als 20% differieren und die Extinktionen über 0,4 liegen.

Zieht man von den gemessenen Extinktionen in unserem Beispiel die graphisch ermittelten Leerwerte ab, so ergeben sich folgende Zahlen:

	1:1′	2:2′	3:3′	4:4′	Mittelwert
Arginin . . .	728:734	720:727	724:732	361:372	
	= 0,992	= 0,991	= 0,9865	= 0,971	0,985
Lysin	516:558	498:582	503:557	250:281	
	= 0,925	= 0,8555	= 0,903	= 0,890	0,893

Multipliziert man die Konzentrationen der Aminosäuren in der Vergleichslösung mit dem durch Mittelwertsbildung gewonnenen Faktor, so erhält man die Konzentration der betreffenden Aminosäure im Hydrolysat. Daraus lassen sich ohne weiteres die absoluten Mengen der verschiedenen Aminosäuren im Hydrolysat errechnen oder ihre Prozentgehalte im hydrolysierten Protein.

Zusammenfassung.

Es wird eine Arbeitsweise angegeben, die es gestattet, schon mit sehr kleinen Mengen (5—10 mg) eines Proteins seine Aminosäurenzusammensetzung quantitativ zu ermitteln.

Zur Trennung der Aminosäuren des Proteinhydrolysats dient die eindimensionale Chromatographie auf Papier mit gepufferten Lösungsmitteln nach E. F. McFarren. Nach Entwicklung der Ninhydrinfärbungen werden diese als Kupfersalz in Lösung lichtelektrisch gemessen. Zur Eichung der ermittelten Farbintensitäten wandert in jedem Versuch auf dem Papier eine Aminosäurenmischung bekannter Zusammensetzung mit. Genaue Werte werden erhalten, wenn in einer Voranalyse die Zusammensetzung des Proteinhydrolysats annähernd ermittelt und jene der Vergleichsmischung ihr angeglichen wird.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung mit Apparaturen.

Literatur.

[1] Block, R. J.: Paper Chromatography. New York: Academic Press 1952. — [2] Bode, F. H., H. J. Hübener, H. Brückner und K. Hoeres: Naturwiss. **39**, 524 (1952). — [3] Boissonnas, R. A.: Helvet. Chim. Acta **33**, 1966, 1972, 1975 (1950). — [4] Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1953. — [5] McFarren, E. F., and J. A. Mills: Anal. Chem. **24**, 650 (1952). — [6] Fowden, L., and I. R. Penney: Nature **165**, 846 (1950); Fowden, L.: Biochem. J. **48**, 327 (1951). — [7] Goodwin, T. W., and J. A. Morton: Biochemic. J. **40**, 628 (1946). — [8] Harding, V. J., and R. M. MacLean: J. of Biol. Chem. **20**, 2/7 (1915). — [9] Hiller, E., F. Zinnert und G. Frese: Biochem. Z. **323**, 245 (1952/53). — [10] Macpherson, H. T.: Biochemic. J. **36**, 59 (1942). [11] Moore, S., and W. H. Stein: J. of Biol. Chem. **176**, 337, 367 (1948); **178**, 53 (1949). — [12] Naftalin, L.: Nature **161**, 763 (1948). — [13] Wieland, Th., and E. Kawerau: Nature **168**, 77 (1951).

Sonderdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 297. Bd. (1954)

Die quantitative Bestimmung reduzierender Zucker auf Papierchromatogrammen

Von den vielerlei Reaktionen, die zum Sichtbarmachen papierchromatographisch getrennter, reduzierender Zucker dienen können, sind bisher zwei auch zu deren quantitativer Bestimmung vorgeschlagen worden: Die Reduktion von Silbersalz zum Metall und die Reduktion von Triphenyltetrazoliumsalz zum roten Formazan.

Die Silbersalz-Reduktion[1,2] gibt nach unseren Erfahrungen die besten Ergebnisse in der von Mc Farren angegebenen Arbeitsweise: Das Silbernitrat wird der pyridinhaltigen Verteilungsflüssigkeit gleich zugegeben, so daß es im ganzen Chromatogramm gleichmäßig verteilt wird, viel gleichmäßiger als durch ein nachträgliches Aufsprühen. Die Entwicklung der Silberflecken geschieht bei 80° in 20 Min., nach einer Behandlung der Papierbogen mit Ammoniakdampf.

Die Silbersalz-Reduktion hat jedoch für quantitative Zwecke grundsätzliche Nachteile. Diese sind begründet sowohl in der Nichteluierbarkeit der Silberflecken vom Papier wie in dem Mangel an Proportionalität zwischen Zucker-Menge und Intensität der Silberflecken.

Die zwangsläufige Messung der Silberschwärzung auf dem Papier macht die Bestimmungen entweder ungenauer oder umständlicher, als in den Verfahren, die eine Photometrierung von Lösungen gestatten. Dieser schwere Nachteil haftet übrigens naturgemäß auch allen anderen Nachweisreaktionen von Zuckern an, die vom Papier nicht eluierbare Farbflecken ergeben. Die mangelhafte Proportionalität zwischen Zuckermenge und Silberschwärzung macht sich nach unseren Erfahrungen bemerkbar, sobald die Konzentrationen der Zucker in den Flecken sich mehr als 1:3 unterscheiden. Vermutlich hängt das unter anderem auch mit der Bildung von Metall-Teilchen wechselnder Größe zusammen.

Die Anwendung von Tetrazoliumsalzen zum Nachweis und zur Bestimmung reduzierender Zucker fußt auf den bekannten Untersuchungen von R. Kuhn und Mitarbeitern über die Verwendung der Formazan-Bildung zur Indikation enzymatischer Reduktionen. Mattson und Jensen[3] haben schon 1950 Triphenyltetrazoliumsalz zu einer Methode der Bestimmung reduzierender Zucker angewandt; Fairbridge, Willis und Booth[4] untersuchten Anfang 1951 ebenfalls diese Reaktion zur Bestimmung von Zuckern, aber auch von anderen reduzierenden Substanzen, in Lösung. Die Anwendung der Formazan-Bildung zum Nachweis und zur Bestimmung reduzierender Zucker auf Papierchromatogrammen

---

[1] E. F. McFarren, Kathleen Brand u. H. R. Rutkowski, Analytic. Chem. **23**, 1146 [1951].

[2] K. Wallenfels, E. Bernt u. G. Limberg, Angew. Chem. **65**, 581 [1953].

[3] A. M. Mattson u. C. O. Jensen, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. **22**, 182 [1950].

[4] R. A. Fairbridge, K. J. Willis u. R. G. Booth, Biochem. J. **49**, 423 [1951].

ist 1950 von Wallenfels vorgeschlagen[5] und in jüngster Zeit von dem gleichen Autor gemeinsam mit Bernt und Limberg durch weitere methodische Angaben erläutert worden[2].

Die Bestimmung reduzierender Stoffe auf Papierchromatogrammen durch Bildung von Formazan aus Tetrazoliumsalz hat im Vergleich zu der Silbersalz-Reduktion den großen Vorteil, daß die Farbflecken sich leicht vom Papier lösen lassen. Die gebildeten Farbstoffmengen können also sehr genau bestimmt werden. Die Reaktion ist außerdem sehr empfindlich, da die molare Extinktion der Formazane groß ist. (E_{482} von Triphenylformazan = $16{,}32 \cdot 10^3$; Methanol-Eisessig; 20^0).

Der Anwendung dieser Reaktion zu genauen quantitativen Bestimmungen papierchromatographisch getrennter Zucker stehen jedoch — wie wir fanden — ebenfalls beträchtliche Schwierigkeiten im Wege und zwar aus folgenden Gründen: 1. Die Reaktion verläuft keinesfalls stöchiometrisch und bis zu einem scharf erkennbaren Ende. Da also nur Teilumsätze nach bestimmten Zeiten gemessen werden können, sind die Ergebnisse sehr stark von der Temperatur bei der Farbentwicklung abhängig. 2. Die „Leerwerte" des Papiers sind nur unter bestimmten Bedingungen relativ niedrig. 3. Proportionalität zwischen Zuckermenge und Farbstoff-Bildung besteht nur, wenn das Reagens in sehr großem Überschuß vorhanden ist.

Es war notwendig, diese Schwierigkeiten eingehend zu untersuchen, um sie beseitigen und genaue Bestimmungen ermöglichen zu können. Hierbei kamen uns die Erfahrungen zu Hilfe, die wir im Laufe der quantitativen Auswertungen der Papierchromatogramme von Eiweißhydrolysaten[6] gewonnen hatten.

1. Die Reagens-Lösung

Zur völlig gleichmäßigen Durchtränkung der Chromatogramme mit dem Reagens haben wir die Papierstreifen nicht besprüht, sondern durch eine ätzalkalische Lösung der Triphenyltetrazoliumbase in Methanol durchgezogen. Ein Verwischen der Zuckerflecken tritt nicht ein; das Lösungsmittel läßt sich in einem Luftstrom von Raumtemperatur in wenigen Minuten aus dem Papier entfernen. Bei der folgenden Entwicklung sind — gleichmäßige Erhitzung vorausgesetzt — die „Leerwerte" auf dem ganzen Papierbogen gleich und die Zuckerwerte konstant reproduzierbar. Das Aufsprühen wäßrig-alkalischer Lösungen des Tetrazoliumsalzes ist viel weniger zweckmäßig, da eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Papiers schwieriger ist und ein Verlaufen der Zuckerflecken sich nicht vermeiden läßt.

Wir fanden weiterhin, daß die Reagens-Lösung mindestens 2% Triphenyltetrazoliumchlorid enthalten muß, um in weiteren Grenzen Proportionalität zwischen Formazan-Bildung und Zuckermenge zu sichern (Abb. 1).

[5] K. Wallenfels, Naturwissenschaften **37**, 491 [1950].
[6] F. G. Fischer u. H. Dörfel, Biochem. Z. **324**, 544 [1953].

In den Versuchen, die der Abb. 1 zugrunde liegen, war die Glucose gleichmäßig auf 4 cm² Papierfläche verteilt und nicht chromatographiert worden. Man erkennt, daß bis zu 4×10^{-7} Mol Saccharid pro Fleck lineare Proportionalität besteht. Chromatographierte Zuckerflecken sind jedoch, einer Gauß'schen Verteilungskurve entsprechend, in der Mitte viel dichter als am Rande. Dementsprechend wurde auf Chromatogrammen mit 2-proz. Tetrazoliumsalz-Lösung Proportionalität der Formazan-Bildung nur bis etwa 3×10^{-7} Mol Saccharid pro Fleck erreicht. Bei Hexosen wären das 54 γ auf etwa 4 –8 cm² Fläche. Da die meisten Saccharide, von

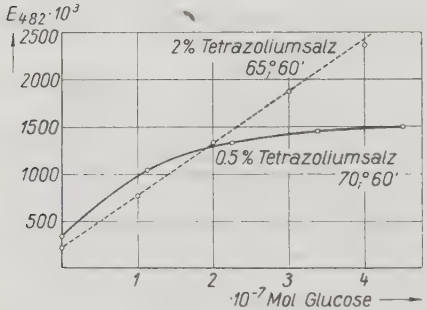

Abb. 1. Der Einfluß der Tetrazoliumsalz-Konzentration im Entwicklungsreagenz auf die gebildete Formazan-Menge

$1-4 \times 10^{-7}$ Mol Glucose gleichmäßig verteilt auf 4 cm² Papier; Reagens: 0,5% bzw. 2,0% Triphenyltetrazoliumchlorid mit 0,5-*n*.NaOH in Methanol. Mittelwerte aus je 2 Einzelbestimmungen.

2-cm-Startlinie ausgehend, sich in diesen Mengen noch gut voneinander trennen lassen, ist es durchaus erwünscht, bis zu solchen Saccharid-Konzentrationen Proportionalität zu erhalten. Die Formazan-Werte, die 1×10^{-7} Mol reduzierendem Saccharid entsprechen, sind nur 3—4 mal größer als die „Leerwerte"; die Genauigkeit solcher Bestimmungen wird daher kleiner.

Bei Anwendung von 4×10^{-7} Mol Saccharid auf 4 cm² und 2-proz. Reagens-Lösung sind auf derselben Papierfläche etwa 8 Moll. Tetrazoliumbase pro Mol Zucker. Sinkt dieser Überschuß auf die Hälfte, dann ist schon keine Proportionalität der Umsätze mehr gesichert. Aus Abb. 1 erkennt man, daß bei Anwendung von 0,5-proz. Tetrazoliumsalz-Lösungen die Linearität der gebildeten Formazan-Mengen schon bei Glucose-Mengen über 1×10^{-7} Mol verloren geht, d. h. bei Werten, die nur das 3—4-fache der Leerwerte betragen.

2. Der Reaktionsverlauf

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Formazan-Bildung mit einer bestimmten Glucose-Menge und einem großen Überschuß (16 Moll.) an Tetrazoliumsalz bei 75° (Abb. 2), so erkennt man, daß 2 Moll. Formazan schnell gebildet werden (15 Min.), daß die Reaktion jedoch nicht etwa bei diesem stöchiometrischen Wert anhält, sondern langsam weitergeht. Nach 2 Stdn. sind durch die Produkte der alkalischen Spaltung der Glucose etwa 2,8 Moll. Formazan pro Mol. Glucose gebildet. Bei 60° sind nach gleicher Zeit nur etwa 1,3 Moll. Formazan entstanden. Da die Papier-Leerwerte nach Bildung von 2 Moll. Formazan durch den Zucker relativ sehr stark zunehmen (bei 75°: gestrichelte Kurve der Abb. 2), würde man sehr ungenaue Ergebnisse erhalten, wenn man die Reaktionsfolge noch weiter ablaufen ließe (siehe den nächsten Abschnitt). Man

mißt also zweckmäßig die Teilumsätze *vor* Bildung von 2 Moll. Formazan.

In diesem Reaktionsbereich bewirkt eine Erhöhung der Temperatur um 5° (zwischen 60° und 75°) ungefähr eine Verdoppelung des Umsatzes. Unterschiede in der Temperatur verschiedener Stellen des Papierbogens von 1° während der Formazan-Bildung können daher Fehler von 20 Proz. und mehr bedingen.

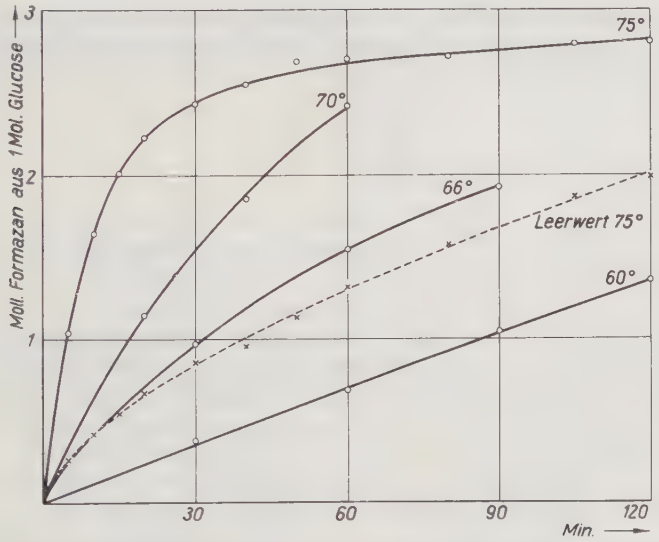

Abb. 2. Der zeitliche Verlauf der Formazanbildung bei verschiedenen Temperaturen

2×10^{-7} Mol Glucose gleichmäßig verteilt auf 4 cm² Papier; 2,0% Triphenyltetrazoliumchlorid mit 0,5-*n*.NaOH in Methanol. Mittelwerte aus je 4 Einzelbestimmungen (nach Abzug der Papier-Leerwerte).

Daraus geht hervor, wie entscheidend wichtig es ist, bei der Entwicklung des Chromatogramms eine bestimmte, konstante und für den ganzen Papierbogen gleiche Temperatur herzustellen. Erst als wir mit der S. 176 näher angegebenen Heizkasten-Anordnung diese Voraussetzungen erfüllt hatten, waren die Bestimmungen reproduzierbar und die verschiedenen Flecken des gleichen Chromatogrammes untereinander vergleichbar.

Wie schon von Wallenfels[5], dann auch von Lüderitz und Westphal[7] angegeben wurde, ist es für die Farbstoff-Entwicklung wesentlich, daß die Chromatogramme in wasserdampfgesättigter Atmosphäre erhitzt werden.

---

[7] O. Lüderitz u. O. Westphal, Z. Naturforsch. **7b**, 548 [1952].

Das Nachlassen der Reduktionswirkung der Saccharide nach Bildung von 2—2,2 Moll. Formazan ist übrigens nicht etwa auf eine alkalische Zerstörung der Tetrazoliumbase oder auf eine Abnahme der Alkalität auf dem Papier zurückzuführen: Wir fanden, daß die Menge Formazan, welche durch eine bestimmte Menge Glucose ($1{,}5 \times 10^{-7}$ Mol) z. B. in 30 Min. bei 70° gebildet wird, dieselbe bleibt, gleichgültig ob der mit Entwicklungsreagens vorbehandelte Papierbogen schon 30 Min. bei 70° im Heizkasten vorerhitzt worden war oder nicht.

3. Die günstigste Reaktionstemperatur und -Dauer

Wie erwähnt, ist ein schwerwiegender Nachteil der Tetrazoliumsalz-Reaktion auf Papierchromatogrammen die relativ starke, nicht ganz zu vermeidende Bildung von Formazan auch auf zuckerfreien Papier-

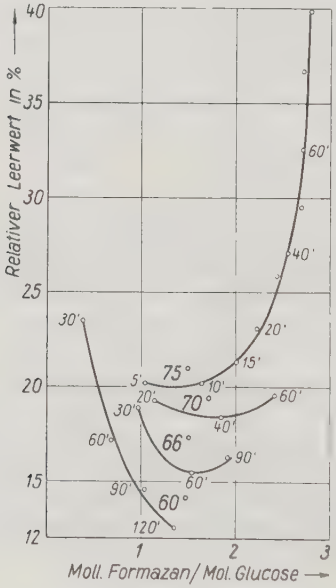

Abb. 3. Die „relativen Leerwerte" bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten

Angegeben sind die Quotienten der Formazan-Werte von zuckerfreien Papierstücken von 4 cm² und der Formazan-Werte anliegender Papierstücke von 4 cm² mit 2×10^{-7} Mol Glucose, gleichmäßig verteilt.

2,0% Triphenyltetrazoliumchlorid mit 0,5-*n*.NaOH in Methanol. Mittelwerte aus 4—6 Einzelbestimmungen.

stellen. Verständlicherweise zeigen jene Bestimmungen die geringsten Streuungen, die die kleinsten „relativen Leerwerte" haben.

Wir ermittelten diese „relativen Leerwerte", d. h. das Verhältnis der Formazan-Menge auf leerem Papier zu der auf einer gleichen Fläche durch eine bestimmte, gleichbleibende Menge Glucose erzeugten Formazan-Menge, im Ablauf der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen. Es ergaben sich folgende Feststellungen (Abb. 3): Zu Beginn der Entwicklung sind die Leerwerte relativ hoch; es sieht so aus, als ob zunächst eine geringe Formazan-Bildung durch im Papier vorhandene reduzierende Bestandteile eintreten würde. Da die Extinktionswerte des zuckergebildeten Formazans noch niedrig sind, werden die Streuungen solcher Bestimmungen dementsprechend groß.

Am günstigsten liegen die Verhältnisse nach Bildung von 1,5—1,8 Moll. Formazan, entspr. einer Entwicklungsdauer von 60 Min. bei 65° bzw. von 30 Min. bei 70°. Nachdem 2 Moll. Formazan entstanden sind (bei 70°: 45 Min., bei 75°: 15 Min.), nehmen die relativen Leerwerte derart zu, daß die Genauigkeit der Bestimmungen stark darunter leidet.

Die Werte streuen verständlicherweise besonders stark, wenn die Flecken nur geringe Zucker-Mengen (weniger als 1×10^{-7} Moll.) enthalten.

In den meisten Fällen zu empfehlen ist aus den dargelegten Gründen eine Entwicklung von 60 Min. bei 65° oder eine solche von 30 Min. bei 70°.

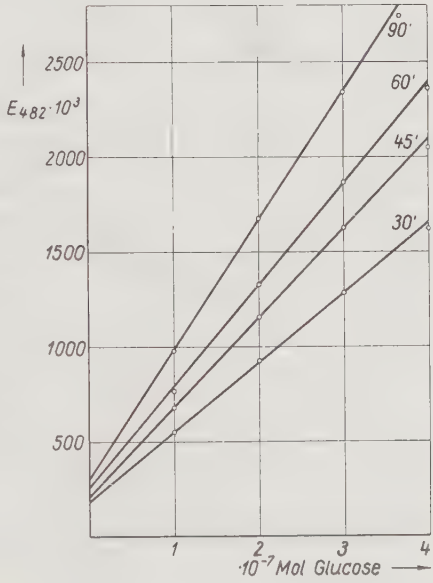

Abb. 4. Abhängigkeit der Formazan-Bildung von der Glucose-Menge bei 65° nach verschiedenen Reaktionszeiten
1—4 $\times 10^{-7}$ Mol Glucose, gleichmäßig verteilt auf 4 cm² Papier; 2,0% Triphenyltetrazoliumchlorid mit 0,5-*n*.NaOH in Methanol.
Mittelwerte aus je 2 Einzelbestimmungen.

Bei 75° müßte die Entwicklung zur Vermeidung allzu hoher Leerwerte nach spätestens 15 Min. unterbrochen werden. Das Einhängen der Chromatogramme in den Heizkasten führt jedoch unvermeidlich eine Abkühlung des oberen Teils seiner wasserdampfgesättigten Atmosphäre herbei, die erst nach etwa 5 Min. ausgeglichen ist. Eine gleichmäßige Erhitzung des ganzen Papierbogens ist daher bei dieser Temperatur nicht gesichert.

Bei 65° hingegen wird das Chromatogramm sehr gleichmäßig entwickelt; die Meßwerte sind gut reproduzierbar im ganzen Bereich der Bildung von 1 Mol. bis 2 Moll. Formazan (30 Min. bis 90 Min.), wie die Geraden der Abb. 4 zeigen.

Die absoluten Leerwerte (ihre Extinktionen werden von den Schnittpunkten der Geraden mit der Ordinate angezeigt) steigen in dieser Zeitspanne nicht ganz auf das Doppelte, die relativen Leerwerte ändern sich nicht wesentlich. Abb. 4 bestätigt im übrigen die lineare Beziehung zwischen Saccharid-Menge und Formazan-Menge bis zu 4×10^{-7} Mol Glucose, wenn 2-proz. Tetrazoliumsalz-Lösungen angewendet werden.

4. Die Formazan-Bildung durch verschiedene Saccharide

Die bisher dargelegten Eigenschaften der Reaktion reduzierender Saccharide mit Tetrazoliumsalz sind durchweg am Beispiel der Glucose ermittelt worden. Andere Monosaccharide und reduzierende Di- und Trisaccharide verhalten sich — soweit wir sie prüften — grundsätzlich gleichartig. Die Geschwindigkeit der Formazan-Bildung durch die ver-

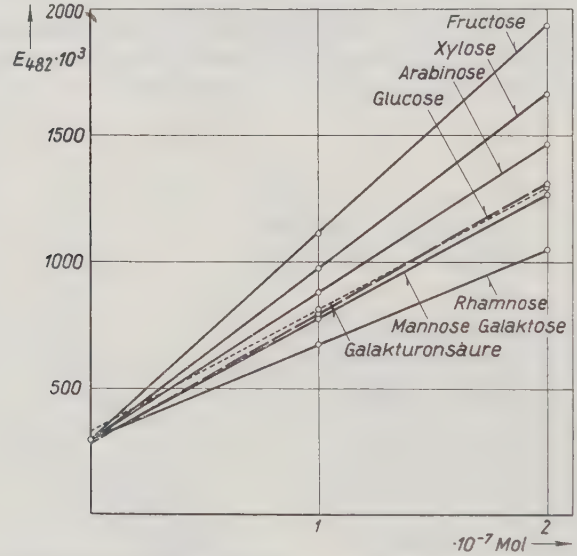

Abb. 5. Formazan-Bildung durch verschiedene Monosaccharide nach 15 Min. bei 75°

1 bzw. 2×10^{-7} Mol Saccharid (10 mm²) gleichmäßig verteilt auf 4 cm² Papier; 2,0% Triphenyltetrazoliumchlorid mit 0,5-*n*.NaOH in Methanol. Mittelwerte aus je 2 Einzelbestimmungen.

schiedenen Saccharide ist jedoch sehr verschieden, so daß die nach bestimmter Zeit durch äquimolare Saccharid-Mengen gebildeten Formazan-Mengen durchaus nicht gleich sind. In alkalisch-wäßriger Lösung bei 25° ist z. B. die Reduktionsleistung der Fructose etwa siebenmal stärker als jene der Glucose[3]. Selbstverständlich verringern sich diese Unterschiede, wenn die Farbstoff-Entwicklung auf dem Chromatogramm erst gegen Ende der Reaktionsfolge, nach Bildung von 2 Moll. Formazan pro Mol. Saccharid, abgebrochen wird. Führt man jedoch aus den oben dargelegten Gründen die Entwicklung (unter den von uns angewandten Bedingungen) nur bis zur Bildung von 2 Moll. Formazan, dann ergeben sich die in Abb. 5 veranschaulichten Verhältnisse.

Glucose und Galakturonsäure reduzieren mit gleicher Geschwindigkeit; kaum langsamer und unter sich gleich schnell reagieren Mannose

und Galaktose. Am schnellsten von allen Monosacchariden vermag Fructose unter der Einwirkung des Alkalis die Tetrazoliumbase zu reduzieren.

Würde man also die durch verschiedene Monosaccharide gebildeten Formazan-Mengen auf die Werte eines Saccharids beziehen, etwa der Glucose, so ergäben sich Fehler bis zu 50%.

Es sei betont, daß unter anderen Versuchsbedingungen, z. B. nach Besprühen des Papiers mit wäßrig-alkalischen Lösungen der Tetrazoliumbase, relative Reduktionsgeschwindigkeiten gefunden werden, die erheblich von den in Abb. 5 wiedergegebenen abweichen. In der von uns angegebenen Arbeitsweise sind jedoch die Verhältnisse der gebildeten Tetrazan-Mengen sehr gut reproduzierbar.

5. Treten bei der chromatographischen Trennung der Saccharide Verluste auf?

Unsere frühere quantitative Untersuchung[6] der eindimensionalen papierchromatographischen Trennung von Aminosäuren-Gemischen hat gezeigt, daß die getrennten Komponenten nicht in den gleichen Mengen gefunden werden, wie sie in der ursprünglichen Mischung vorhanden sind. Durch die Chromatographie treten „Verluste" auf, vor allem bei der Vertreibung der Verteilungsflüssigkeiten, und weitere Verschiebungen der Mengenverhältnisse, welche auf die Beeinflussung der Abtrennung jeder einzelnen Aminosäure durch die anderen Komponenten des Gemisches zurückzuführen sind. Da es sonst nicht möglich wäre, die Mengen der chromatographierten Aminosäuren in eine einfache Beziehung zu bringen mit den im Gemisch tatsächlich vorhandenen, ist es notwendig, Vergleichsgemische bekannter Zusammensetzung mitwandern zu lassen. Diese liefern umso genauere Bezugswerte, je näher sie in ihrer Zusammensetzung dem zu analysierenden Gemisch angeglichen worden sind.

Wir prüften, ob bei den Sacchariden ähnliche Verhältnisse festzustellen sind, und geben in Tab. 1 ein Versuchsbeispiel.

Tab. 1. „Verluste" bei der Chromatographie einiger Saccharide.

	Saccharide einzeln aufgetragen		Aus dem Gemisch	Differenz der Extinktionen in %	
	a nicht gewandert $E_{482} \cdot 10^3$	b gewandert $E_{482} \cdot 10^3$	c gewandert $E_{482} \cdot 10^3$	a—b	a—c
Galaktose	1142	1114	1093	2,5	4,3
Mannose	1215	1167	1176	4,0	3,2
Xylose	1790	1767	1767	1,3	1,3

Die drei Saccharide wurden in Mengen von je 2×10^{-7} Mol sowohl einzeln wie im Gemisch chromatographiert. Nach erfolgter Wanderung und Entfernung der Lösungsmittel wurden die gleichen Mengen der drei Saccharide auf das Papier gebracht, und zwar möglichst in die Nähe der Flecken der gewanderten, jeweiligen Zucker und auf möglichst gleiche Flächen. Nach Entwicklung der Chromatogramme (25 Min. bei 70°) ergaben sich die angeführten Unterschiede (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen).

Die „Verluste" von Sacchariden bei der Chromatographie sind also sehr gering; bei Ausführung weniger Einzelbestimmungen liegen sie innerhalb der Streuungen. Aus den Durchschnittswerten größerer Meßreihen läßt sich jedoch schließen, daß einige (2—4) Prozente der Saccharide „verschwinden", d. h. wohl auf der Bahn verbleiben. Reelle Unterschiede in der Größe der „Verluste" nach Einzelwanderung der Komponenten und nach Wanderung aus einem Gemisch waren nicht festzustellen, auch nicht als kleine Mengen eines Saccharids von großen Mengen anderer Saccharide getrennt wurden. So ließ sich z. B. Mannose aus einem Gemisch mit der 20-fachen Menge Galaktose und Glucose chromatographisch abtrennen mit einem „Verlust" von nur 2,7%.

Die chromatographische Trennung der Saccharide unterscheidet sich also von jener der Aminosäuren vorteilhaft durch die Geringfügigkeit der „Verluste" an Einzelkomponenten und durch die Unabhängigkeit dieser „Verluste" von der Zusammensetzung des Gemisches.

Sehr nützlich ist weiterhin die Tatsache, daß — im Vergleich mit den Aminosäuren — die meisten Saccharide in viel größeren Mengen (bis zu 150 γ Einzelkomponente auf 2 cm Startlinie) papierchromatographisch noch gut getrennt werden.

6. Die Ausführung der Analysen

Die Versuchsbedingungen, unter welchen die Saccharid-Bestimmungen durch Formazan-Bildung ausgeführt werden müssen, sind — wie aus dem Gesagten hervorgeht — eng begrenzt; ihre Einhaltung garantiert jedoch genaue Ergebnisse. Monosaccharide, die in Mengen von 20—80 γ auf 4 cm² Papier aufgetragen und *nicht* chromatographiert werden, lassen sich mit Streuungen der Meßwerte von nur 0,2—1,5% bestimmen. Nach der Wanderung und Trennung der Saccharide betragen die maximalen Streuungen der Messungen 4—8%, die mittleren 2—4%. Leider ist es nicht möglich, für die einzelnen Saccharide „Eichkurven" aufzustellen, die ein für alle Male gültig wären. Die starke Abhängigkeit der zuckererzeugten Formazan-Menge und auch des Papier-Leerwertes von Entwicklungstemperatur und -Dauer verbietet das Beziehen der Meßwerte verschiedener Chromatogramme aufeinander. Man muß daher die Formazan-Werte der einzelnen Komponenten der analysierten Mischung beziehen auf die Werte einer Vergleichsmischung, die auf dem gleichen Papierbogen mitgewandert ist. Zweckmäßig werden beide Mischungen in gestaffelten Mengen auf den gleichen Papierstreifen nebeneinander aufgetragen. Die Papier-Leerwerte lassen sich dann (nach sorgfältigem Ausschneiden der Formazan-Flecken) ohne Wägung der Papierstücke hinreichend genau graphisch ermitteln (siehe S. 177).

Wir brachten meistens auf 2 cm Startlinie 5—20 mm³ Lösung auf, von einer Konzentration, die 10—50 γ jeder einzelnen Saccharid-Komponente entsprach. Es lassen sich derart z. B. auf zwei Papierstreifen von 25 cm Breite (halbe Whatman-Bogen) 12 Einzelbestimmungen gleichzeitig ausführen. Diese Zahl gestattet schon eine genauere Mittelwertbildung, mit einem maximalen Fehler von 3%. Da größere „Verluste" an Sacchariden bei der Wanderung auf dem Papier nicht auftreten und vor allem keine Abhängigkeit der wiedergefundenen Mengen der Einzelkomponenten

von den übrigen Bestandteilen der Mischung nachzuweisen ist (im Gegensatz zu den bei der Chromatographie von Aminosäuren-Mischungen gefundenen Verhältnissen), braucht die quantitative Zusammensetzung der Vergleichsmischung nicht jener der (durch eine Voranalyse annähernd ermittelten) Analysenmischung nahe gebracht zu werden. Größere Streuungen der Werte treten nur auf, wenn die Konzentrationen eines Saccharids in der Analysenlösung und in der Vergleichslösung sich um mehr als 100% unterscheiden.

Der für eine Analyse erforderliche Zeitaufwand läßt sich auf etwa 3 Arbeitstage angeben. In $1\frac{1}{2}$ Tagen können z. B. 3 Gemische einer Voranalyse unterworfen werden (zur Identifizierung der Komponenten und Schätzung ihrer Mengenverhältnisse), vorausgesetzt, daß die Trennung aller Bestandteile mit *einer* Chromatographie gelingt (12 Einzelbestimmungen auf einem Bogen, pro Gemisch also 4 Einzelbestimmungen; s. S. 175). Enthält ein solches Gemisch nur 4—6 in einem Arbeitsgang trennbare Komponenten, die sich in den Konzentrationen nicht mehr als 1:5 unterscheiden, dann kann in weiteren $1\frac{1}{2}$ Tagen die genaue Bestimmung der Saccharide ausgeführt werden (12 Einzelbestimmungen, d. h. je 6 Trennungen des Analysengemisches und des Vergleichsgemisches). Wenn zahlreiche Analysen in Routinearbeit ausgeführt werden, läßt sich der Zeitaufwand erheblich kürzen.

Als Beleg für die Leistungsfähigkeit der Methode geben wir in Tab. 2 die Ergebnisse von zwei Analysen wieder. Analyse I wurde von H. Dörfel ausgeführt, Analyse II von einem weiteren Mitarbeiter, der chromatographische Methoden sich gerade anzueignen begann. In beiden Fällen wurde zur Vermeidung von Vorurteilen den Analytikern die Zusammensetzung der Mischungen erst nach Abschluß ihrer Arbeit und Mitteilung der Ergebnisse bekanntgegeben.

Tab. 2. Ergebnisse der Analysen von 2 Gemischen von Monosacchariden.

Zucker	Eingewogen		Gefunden		Fehler	
	mg	%	mg	%	abs.	%
I Galakturons.	18,3	4,61	18,6	4,71	+ 0,3	+ 1,6
Galaktose .	76,2	19,19	74,8	18,94	— 1,4	— 1,8
Glucose . .	146,2	36,80	145,4	36,83	— 0,8	— 0,5
Mannose . .	79,3	19,97	77,3	19,57	— 2,0	— 2,5
Xylose . . .	77,2	19,43	78,8	19,95	+ 1,6	+ 2,1
Summe	397,2	100,00	394,9	100,00	— 2,3	— 0,6
II Galaktose .	49,9	25,15	50,4	25,18	+ 0,5	+ 1,0
Glucose . .	65,6	33,07	67,5	33,73	+ 1,9	+ 2,9
Mannose . .	62,7	31,60	62,5	31,24	— 0,2	— 0,3
Xylose . . .	20,2	10,18	19,7	9,85	— 0,5	—2,5
Summe	198,4	100,00	200,1	100,00	+ 1,7	— 0,9

Es wurden 12 Einzelbestimmungen ausgeführt.

Die maximalen Streuungen betrugen bei den einzelnen Sacchariden 4 bis 9%, die mittleren Streuungen 2 bis 4%.

Für viele Zwecke wird auch eine größere Fehlergrenze genügen und die „halbquantitative" Analyse eines Saccharid-Gemisches durchaus zureichend sein. Durch den erheblich verminderten Zeitaufwand ge-

winnt man die Möglichkeit zur Ausführung von Serien-Bestimmungen durch einen einzelnen Analytiker (6—8 Bestimmungen in 2 Arbeitstagen). Diese Analysen werden dann wie die „Voranalysen" ausgeführt, d. h. mit nur je zwei gestaffelten Mengen (z. B. 5 und 10 mm³) der Analysenlösung (z. B. 2-proz. in Bezug auf die Summe der Komponenten) und der Vergleichslösung.

Die Fehler entsprechen etwa den maximalen Streuungen der Einzelbestimmungen, liegen also bei maximal 8%; größer können sie allerdings sein für solche Komponenten, welche zu weniger als 5% im Analysengemisch enthalten sind.

Wir hoffen, daß die Ausarbeitung des Formazan-Verfahrens zu einer zuverlässigen quantitativen Methode der Bestimmung reduzierender Saccharide für die Bearbeitung vieler Fragen der Zucker-Chemie von Nutzen sein wird.

Methodische Angaben

1. Die Analysen-Lösung

Aus sauren Polysaccharid-Hydrolysaten ist die Säure entweder durch Fällung (Schwefelsäure, Oxalsäure) vollständig zu entfernen oder durch Verdampfen im Vak. (Salzsäure) größtenteils zu beseitigen. Die besten Bedingungen zur Hydrolyse von Polysacchariden und zur Vorbereitung der Hydrolysate zur Chromatographie werden in einer späterer Arbeit angegeben. Ein geringer Salzsäure-Gehalt der Analysenlösung, bis etwa 0,2-*n*., stört zwar die Trennungen nicht; wir sahen jedoch, daß schon wenige mm³ einer 0,1—0,5-*n*.Salzsäure, mit warmer Luft am Startfleck eingedampft, die Cellulose des Papiers so angreift, daß bei der Entwicklung ein Formazan-Fleck dort entsteht und auch Cellobiose- und Glucose-Flecken sichtbar werden. Es ist daher besser, die Lösungen bis zum Verschwinden der mineralsauren Reaktion zu neutralisieren. Die Trennungen von 0,5—3,0-proz. Saccharid-Lösungen werden durch Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 0,2-*m*. nicht gestört.

Die Saccharid-Lösungen sind möglichst bald nach ihrer Herstellung zu chromatographieren. Wir beobachteten in mehreren Beispielen nach einigen Wochen eine Veränderung der Komponenten, trotzdem die Lösungen nach Zusatz eines Konservierungsmittels im Eisschrank aufbewahrt worden waren. Es empfiehlt sich, vor der Chromatographie die Gesamtkonzentration an reduzierenden Zuckern in der Analysen-Lösung cuprometrisch, etwa nach Lehmann-Maquenne-Schoorl[8], zu bestimmen und auch eine Titration der Aldosen nach Willstätter und Schudel auszuführen. Für die bequeme und genaue Auftragung der richtigen Zuckermengen auf das Papier mit einer Mikropipette (5 bis 20 mm³) ist es zweckmäßig, die Konzentration der Analysen-Lösung so zu wählen, daß jede einzelne Komponente zu 0,2 bis 0,5% darin enthalten ist, die Lösung insgesamt also 1—2% enthält. Wenn sehr starke Unterschiede im Mengenverhältnis einzelner Saccharide vorliegen, ist es besser, zwei verschiedene Verdünnungen der Lösung herzustellen und zu chromatographieren: Eine, die in Bezug auf jede der schwach vertretenen Komponenten etwa 0,2– 0,5-proz. ist, und eine zweite, welche die stark vertretenen Komponenten in dieser Konzentration enthält.

Falls das zu analysierende Zuckergemisch gänzlich unbekannt ist, wird zur Identifizierung seiner einzelnen Komponenten zweckmäßig eine qualitative Chromatographie vorausgeschickt, auch um die Eignung der Verteilungsflüssigkeit zur Trennung der Bestandteile zu prüfen. Das weiter unten angegebene Verteilungsgemisch trennt z. B. Mannose und Fructose nicht. Zur Bestimmung von Mannose ist es daher notwendig, durch eine Ketose-Reaktion vorher auf Fructose zu prüfen.

[8] G. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, Springer 1932, Band 2, S. 786.

2. Die Vergleichslösung

Die Vergleichslösung für die Analyse wird aus den Komponenten gemischt, welche die qualitative Trennung angezeigt hat, und zwar etwa in den dort geschätzten Mengenverhältnissen; sie ist ebenfalls insgesamt 1—2-proz. zu machen. Zur Voranalyse trägt man auf vier nebeneinander liegende Startlinien von je 2 cm Länge (mit je 2 cm Abstand) abwechselnd 5 und 10 mm³ der 2-proz. Analysen- und Vergleichslösung auf; bei 1-proz. Lösungen sind die doppelten Flüssigkeitsmengen aufzutragen. Chromatographie, Farbentwicklung und Auswertung geschehen in der in den folgenden Abschnitten angegebenen Weise.

Es gelingt meistens, die Zusammensetzung und die Gesamtkonzentration der Vergleichslösung jener der Analysenlösung schon in der Voranalyse zureichend anzupassen. Wenn die Voranalyse bei einzelnen Komponenten ein Abweichen der gefundenen Werte von den Vergleichswerten um 100% oder mehr ergibt, dann ist zur Erzielung genauer Werte bei der Wiederholung der Bestimmung eine besser angeglichene Vergleichslösung anzuwenden.

Auf die Reinheit der Vergleichs-Saccharide ist besonders zu achten: Sie müssen sich papierchromatographisch einheitlich verhalten, frei von Asche sein und bei 60° (über P_2O_5 im Hochvak.) gewichtskonstant bleiben (Rhamnose verändert sich unter Gewichtsverlust schon bei dieser Temperatur). Glucose liegt in den Handelspräparaten meistens als Monohydrat vor.

3. Die Chromatographie

Die Analysen- und die Vergleichslösung werden auf abwechselnden Plätzen auf der Startlinie der Papierbogen (Whatman Nr. 1, ganze oder halbe Bogen) aufgetragen, und zwar so, daß je zwei benachbarte Startplätze gleiche Mengen beider Lösungen enthalten. Zweckmäßig sind Frontbreiten von je 2 cm (gebildet aus einzelnen, mit Warmluft immer wieder getrockneten Tupfen aus der Mikro-Pipette). Zwischen den einzelnen Bahnen sowie an den Rändern des Papierbogens bleiben 2 cm frei. Wir haben meistens auf 2 Streifen von je 25 cm Breite 12 einzelne Trennbahnen sich ausbilden lassen. Zweckmäßig trägt man drei, mindestens aber zwei verschiedene Mengen der Lösungen auf, die sich wie 1:2 verhalten (z. B. 5 und 10 mm³). Sie sind so zu wählen, daß jeder auszuwertende Zuckerfleck nicht weniger als 10 γ und nicht mehr als 50 γ Monosaccharid bzw. etwa doppelte Mengen Disaccharid enthält. Bei kleineren Mengen der Einzelkomponenten verursachen die Papier-Leerwerte schon Ungenauigkeiten, bei größeren läuft man Gefahr, daß die sich bildende Formazan-Menge nicht mehr der Saccharid-Menge proportional ist.

Als Lösungsmittel für die Chromatographie fanden wir das von Jermyn und Isherwood angegebene[9], von Mc Farren und Mitarbb.[1] modifizierte Gemisch aus Essigester, Pyridin und Wasser gut geeignet. Die Trennung der meisten Mono- und Disaccharide gelingt damit scharf; das Lösungsmittel läßt sich leicht vom Papier abdampfen; zurückbleibende Spuren beeinträchtigen die Formazanbildung nicht (im Gegensatz zu Phenol).

Zur Herstellung der Verteilungsflüssigkeit wird 1 Tl. reines Pyridin mit 2,5 Tln. Essigester und 3,5 Tln. Wasser (v:v) geschüttelt; die organische Phase wird verwendet. Nach dieser Herstellungsweise geht fast die Hälfte des Pyridins in der wäßrigen Phase verloren; wir fanden es daher sparsamer, das Verteilungsgemisch aus 40 Vol. Essigester, 11 Vol. Pyridin (98%) und 6 Vol. Wasser zu bereiten (bei 20°). Diese Mischung bleibt homogen und entspricht der oben angegebenen organischen Phase (Versuche von J. Nebel). Die Chromatographie-Kästen stehen in einem Raum mit konstanter Temperatur (20°). Ihr Boden ist mit 500 ccm Verteilungsflüssigkeit bedeckt. Die inneren Seitenwände sind mit Filtrierpapier beklebt, das die Verteilungsflüssigkeit hochsaugt und dadurch schneller verdampfen läßt. Die vorbereiteten Papierbogen werden zur Sättigung mit den Dämpfen des Flüssigkeitsgemisches in die Kästen gehängt 2 Stdn. bevor der Trog durch eine verschließbare Bohrung in der Deckplatte mit der Verteilungsflüssigkeit beschickt und so die

[9] M. A. Jermyn u. F. A. Isherwood, Biochem. J. 44, 402 [1949].

Chromatographie eingeleitet wird (s. auch l. c.[6]). Im 20 Stdn. dauernden, absteigenden „Durchlaufchromatogramm" findet eine gute Trennung statt von z. B. Galakturonsäure, Laktose, Maltose, Galaktose, Glucose, Mannose, Xylose, Ribose und Rhamnose (geordnet nach steigenden R_F-Werten). In Abwesenheit von Uronsäuren wird Glucosamin von den übrigen angeführten Monosen getrennt. Mannose und Fructose lassen sich derart nicht unterscheiden. Die Trennung von Mannose und Arabinose ist für eine Identifizierung, jedoch nicht für eine quantitative Bestimmung zureichend.

Rhamnose wird in 20 Stdn. etwa 30 cm weit transportiert und läuft dabei zu großen Flecken auseinander, deren Auswertung wegen der beträchtlichen Papier-Leerwerte ungenau wird. Exaktere Bestimmungen der Rhamnose werden daher besser auf einem gesonderten Chromatogramm mit 10—12 Stdn. Laufzeit ausgeführt, wobei auch Ribose oder Xylose mit Vorteil ausgewertet werden können.

Eine schärfere Trennung auch von Mannose und Arabinose läßt sich erreichen mit etwa gleichen Laufstrecken aber doppelten Laufzeiten, wenn die Verteilungsflüssigkeit mit nur 0,8 Vol.-Tln. Pyridin (auf 2,5 Essigester und 3,5 Wasser) hergestellt wird (verwendet wird die leichte Phase; nach Versuchen von G. Dietrich).

Nach der Chromatographie wird die Entfernung der Verteilungsflüssigkeit aus den Papierbogen durch einen Luftstrom von Raumtemperatur in 30 Min. erreicht (Ventilator-Trockenschrank). Die Papierbogen werden dann quer zur Laufrichtung so abgeschnitten, daß sie etwa 40 cm lang bleiben und die Flecken der am wenigsten gewanderten Zucker etwa 3 cm von einem Rand, die übrigen auf der Hälfte bis zwei Drittel der Bogenlänge sich befinden. Vor der Farbentwicklung werden die Bogen am Rande der zuckerfreien Seite gefalzt, so daß ein Streifen von etwa 3 cm Breite zum Auflegen auf die Deckplatte des thermokonstanten Kastens entsteht. Man erreicht so, daß die Bogen bis etwa 37 cm Tiefe in dem Kasten hängen und die Reaktionsstellen in seiner unteren Hälfte sind.

4. Die Tetrazoliumsalz-Lösung

Die Reagenslösung wird unmittelbar vor dem Tränken der Papierbogen zubereitet, durch Mischen gleicher Vol.-Tle. 1-*n*.methanol. Natronlauge und 4-proz. Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung in Methanol. 40 ccm Reagenslösung genügen zum Tränken von zwei halben Whatmanpapier-Bogen. Das Methanol darf Aceton auch nicht in Spuren enthalten, da sonst die Papier-Leerwerte größer werden.

Die getrockneten Papierbogen werden entgegen der Laufrichtung durch die Reagenslösung gezogen, die sich in einem flachen Trog befindet (zwei Glasstreifen 30×5 cm werden im stumpfen Winkel zusammengekittet und mit seitlichen Glasplatten zum Trog geschlossen). Die anschließende Entfernung des Methanols durch einen Luftstrom von Raumtemperatur (Ventilator-Trockenschrank) findet in 8—10 Min. statt, ohne daß Formazan-Bildung eintritt. Nun werden die Papierbogen in die wasserdampfgesättigte Atmosphäre des thermokonstanten Entwicklungsgefäßes eingehängt. Vom Mischen der Reagenslösung bis zum Einhängen der Chromatogramme in den Entwicklungskasten ist jede stärkere Belichtung zu vermeiden. Schwächeres, diffuses Tageslicht schadet bei schnellem Arbeiten jedoch nicht.

5. Die Entwicklung des Chromatogramms

Als Heizgefäß zur Entwicklung der Formazan-Farbe verwenden wir einen doppelwandigen Kasten aus Kupferblech, dessen Innentemperatur mit Hilfe eines Höppler-Ultrathermostaten eingestellt und konstant gehalten wird.

Der innere Kasten hat 12 cm Breite, 32 cm Länge und 40 cm Höhe, der damit wasserdicht verlötete äußere Kasten mißt $14 \times 34 \times 41$ cm. Das warme Wasser wird von der Pumpe des Thermostaten durch einen am Fuße der einen Schmalseite des Kastens befindlichen Stutzen eingedrückt, strömt durch den Raum zwischen den beiden Kästen und fließt durch einen Stutzen am oberen Rand der entgegengesetzten Schmalseite in den Thermostaten zurück. Am Boden des inneren Kastens steht 0,5 cm hoch Wasser. Das ganze Gefäß ist zur Isolierung gegen Wärmeverluste mit Plexiglas-Platten umkleidet und außerdem in einer Isoliermasse („Iporka") einge-

bettet, die von einem geräumigeren Kasten aus Sperrholzplatten zusammengehalten wird. Der Kupferblech-Kasten ist bedeckt durch eine aufgeschraubte Plexiglas-Platte von 10 mm Dicke, die zwei parallele Schlitze von 30 cm Länge und 0,5 cm Breite zum Einhängen der Papierbogen hat. Diese Deckplatte wird schon vor dem Versuch mit wasserdampfdichten, dicken Schaumgummi-Streifen bedeckt; diese klemmen während des Versuches die umgefalzten Ränder der eingehängten Papierbogen.

Vor Beginn der Entwicklung ist Temperaturkonstanz im Kasten-Inneren abzuwarten. Die Schlitze im Kasten-Deckel sind etwa 15 Min. vor dem Einhängen der Bogen mit Filtrierpapier trocken zu wischen, um Wasserflecken auf den Chromatogrammen zu vermeiden; denn diese würden die Formazan-Bildung sehr stören.

Wir haben meistens 60 Min. bei 65° oder 30 Min. bei 70° entwickelt.

6. Die Auswertung der Formazan-Flecken

Gleich nach dem Herausziehen der Chromatogramme aus dem Heiz-Kasten werden die Formazan-Flecken mit Bleistift bezeichnet und einzeln ausgeschnitten, so daß die Papierstücke für ein und denselben Zucker möglichst flächengleich werden. Wenn das bei Kunstlicht geschieht, ist das Auswaschen der überschüss. Tetrazolium-Base oder ihre Neutralisation überflüssig. Die ausgeschnittenen Papierstücke werden in Reagenzgläser gebracht, in denen sich genau je 5 ccm Lösungsmittel befinden, gemischt aus 10 Vol.-Tln. Methanol (puriss.) und 1 Vol.-Tl. Eisessig (puriss.). Die Elution des Formazans ist nach 10 Min. bei 2—3-maligem Umschütteln vollständig.

Die Extinktion der Lösungen wird mit dem Beckman-Spektrophotometer DU in 1-cm-Küvetten bei 482 mμ-Wellenlänge gemessen, mit dem Eluiergemisch als Kompensationslösung. Bei dieser Wellenlänge kann sehr gut auch mit der Wasserstoff-Lampe gearbeitet werden, falls die Lichtintensität der Wolframlampe infolge Schwankungen der Netzspannung zu wenig konstant ist.

Die Extinktionsmessungen brauchen nicht unmittelbar nach der Elution stattzufinden, denn das Formazan ist in Methanol-Eisessig bei Vermeidung starker Belichtung haltbar. Nach 14 Tagen (Raumtemperatur, Kunstlicht) hatte eine solche Lösung ihre Absorption nicht geändert. Die molare Extinktion von Triphenylformazan im Methanol-Eisessig-Elutionsgemisch bestimmten wir zu $16{,}32 \times 10^3$ (482 mμ; 20°; Mittel aus 10 Messungen).

7. Die Berechnung der Zucker-Konzentrationen aus den gemessenen Extinktionen

Die Papier-Leerwerte sind bei der Auswertung der Chromatogramme genau zu berücksichtigen, da sie — selbst unter den günstigsten Entwicklungsbedingungen — relativ hoch sind. Ihre Bestimmung erfolgt graphisch (s. auch l. c.[6]): Man trägt die gemessenen Extinktionen der Eluate der Formazan-Flecken einer jeden Zucker-Komponente von Analysen- und Vergleichslösung als Funktion der Anzahl mm^3 chromatographierte Lösung auf Millimeterpapier auf und zieht durch die Mittelwerte gleicher Lösungsmengen je eine Gerade. Die Schnittpunkte der beiden Geraden mit der Ordinate geben die Leerwerte für Analysen- bzw. Vergleichslösung des betreffenden Zuckers an. Wurden die Farbflecken desselben Zuckers genau flächengleich ausgeschnitten, so müßten beide Schnittpunkte zusammenfallen; praktisch wird man geringe Abweichungen erhalten. Der Mittelwert der Schnittpunktordinate („Leerwert") wird von den für jedes Saccharid gemessenen Extinktionen abgezogen. Es zeigte sich, daß diese graphisch ermittelten Leerwerte übereinstimmen mit solchen, die in nächster Nähe der Zuckerflecken von flächengleichen Papierstücken experimentell ermittelt wurden. Die zur Formazanbildung auf zuckerfreiem Papier führenden Reaktionen spielen sich also in gleichem Umfang auch in den Zuckerflecken ab.

Nun werden für je zwei benachbarte Trennungsbahnen die Quotienten aus den korrigierten Extinktionen der Analysenlösung und der Vergleichslösung derselben Zucker-Komponente gebildet. Der Mittelwert dieser Quotienten, multipliziert

mit der Konzentration des betreffenden Zuckers in der Vergleichslösung ergibt die gesuchte Konzentration in der Analysenlösung.

Durch diese Art der Auswertung werden Störungen durch etwaige Unregelmäßigkeiten der chromatographischen Trennung oder der Farbentwicklung möglichst ausgeschaltet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung mit Geräten.

Zusammenfassung

Die Reaktion zwischen reduzierenden Sacchariden und Triphenyltetrazoliumbase auf dem Papierchromatogramm wird näher untersucht.

Es wird eine Arbeitsweise angegeben zur quantitativen Bestimmung der Saccharide (mit einem maximalen Fehler von 3%), durch Photometrierung des gebildeten Formazans in Lösung.

Das Gift der Honigbiene.

II. Mitteilung.

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Bienengift-Fraktionen.

Die Hauptkomponente des Bienengiftes, ein stark basisches Protein, das unter anderem durch seine lytische Wirkung auch auf serumfrei gewaschene Erythrocyten gekennzeichnet ist (W. Neumann und Mitarb. [14, 15]), läßt sich von der indirekt hämolytisch wirkenden Phospholipase A und auch von den anderen Eiweißbestandteilen des Giftsekrets durch Chromatographie auf dem Papierbogen oder in der Cellulosesäule trennen. In der vorstehenden Mitteilung sind die näheren Bedingungen dieser Trennung angegeben worden, ebenso wie die analytischen Daten des Proteins und die Versuche zu seiner elektrophoretischen Charakterisierung und zur Messung seiner Diffusionskonstante.

Da diese Hauptkomponente, als Fraktion I bezeichnet, sich bisher in Chromatographie und Elektrophorese als einheitlich erwiesen hat, haben wir die Ermittlung ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung in Angriff genommen.

Durch welche Besonderheiten der Teile oder ihrer Zusammenfügung zeichnet sich dieses toxische Protein vor anderen aus? Auf diese Frage kann einstweilen, trotz der zahlreichen bisherigen Arbeiten über die „Neurotoxine" und die „Hämolysine" tierischer Gifte, z. B. der Schlangengifte, nicht einmal eine begründete Vermutung als Antwort gegeben werden. Die quantitative Analyse der Proteinbausteine erscheint jedoch als eine der ersten Voraussetzungen für tieferes Eindringen. Sie gibt z. B. darüber Auskunft, ob außer den Aminosäuren andersartige Bestandteile, „prosthetische Gruppen", im untersuchten Protein vorhanden sein können.

Zum Vergleich mit Fraktion I haben wir auch die als Fraktion II abgetrennten Giftdrüsen-Proteine untersucht, obwohl diese nicht nur die indirekt hämolysierende Phospholipase A als Hauptbestandteil enthalten, sondern auch weitere Komponenten. In beiden Fraktionen liegen die stark basischen Proteine als Hydrochloride vor, entsprechend ihrer Isolierung nach der Chromatographie durch Zerlegung der Pikrate mit salzsaurem Aceton.

Methodik.

Die analysierten Protein-hydrochloride. Durch zweifach wiederholte Fällung des rohen Bienengiftes mit Pikrinsäure und Zerlegung des Pikrats mit salzsaurem Aceton war (mit etwa 70% Gewichtsausbeute) das sogenannte „Pikrat-Gift" erhalten worden. Durch Chromatographie in der Cellulosepulversäule und nachfolgender Isolierung über das Pikrat hatten sich daraus etwa 70 Gew.% Fraktion I und 20 Gew.% Fraktion II gewinnen lassen. Fraktion I ist frei von Phospholipasewirkung. Fraktion II enthält hingegen, der pharmakologischen Prüfung entsprechend, außer der Phospholipase noch etwa 10 Gew.% der direkt hämolysierenden Fraktion I, außerdem in kleineren Mengen wahrscheinlich noch zwei andere Proteinbestandteile. *Fraktion II* wurde ohne weitere Zerlegungsoperation analysiert (Tab. 2). *Fraktion I* hingegen wurde der Elektrophorese in der TISELIUS-Apparatur bei p_H 6,86 unterworfen. Die einheitlich wandernde Spitzenfraktion (Ia der I. Mitt. S. 450) wurde (nach der Isolierung über das Pikrat) am eingehendsten analysiert (Tab. 1). Der nahezu am Startpunkt verbleibende, einen „Extragradient" bildende Anteil [11] der Fraktion I (Ib der I. Mitt. S. 450) wurde vergleichshalber ebenfalls analysiert, jedoch nicht zu wiederholten Malen. Die Ergebnisse der Elementaranalysen von Fr. Ia, Fr. Ib und Fr. II sind in der I. Mitt. S. 450 angegeben.

Die Hydrolyse. Die Proteinhydrochlorid-Präparate waren im Hochvakuum bei 60° gewichtskonstant getrocknet. 5—10 mg Substanz wurden in zugeschmolzenen, Stickstoff-gefüllten Glasröhrchen mit 1 cm³ reiner, redestillierter 20%iger Salzsäure 22—24 Std im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Die Hydrolysate von Fraktion I waren völlig klar und nur leicht gelblich, jene von Fraktion II schieden braune Flöckchen aus. Das ließ sich vermeiden durch Hydrolyse mit einem Gemisch aus 20%iger Salzsäure und 95%iger Ameisensäure 1:1. Für die Tryptophanbestimmungen hydrolysierte man alkalisch mit 1 cm³ heißgesättigter Bariumhydroxydlösung, ebenfalls unter Stickstoff, 24 Std bei 125—130°. Die sauren Hydrolysate wurden quantitativ in ein 5 cm³-Kölbchen übergeführt, im Exsiccator zur Trockne gebracht, und zweimal nach Zugabe von je 0,5 cm³ Wasser wieder eingetrocknet. Schließlich wurde die verbleibende Salzsäure mit wenigen Tropfen 0,5 n NaOH bis p_H 6 neutralisiert. Nach erneutem, scharfem Eintrocknen wurde der Rückstand in genau 1 cm³ destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung ist verschlossen bei 0° aufzubewahren. Die Bariumhydroxyd-Hydrolysate wurden im Zentrifugenglas mit Schwefelsäure bis p_H 6 versetzt, klar zentrifugiert und mit den Waschwässern des zweimal heiß ausgezogenen Bariumsulfatniederschlags zusammen eingetrocknet.

Die zweidimensionale Papierchromatographie.

Chromatographiert wurde auf $^1/_4$-Bogen Whatman-Papier Nr. 1, die 30 × 25 cm zugeschnitten waren. 80—100 γ Hydrolysat wurden 3 cm diagonal von einer Ecke entfernt punktförmig aufgetragen. Diese Menge entspricht 8—10 mm³ 1%iger Lösung; diese darf jedoch, wenn scharfe Flecken erzielt werden sollen, nur in Teilmengen von je 1 mm³ aufgetupft werden, die man jedesmal im heißen Luftstrom eintrocknet. Die Papierstücke wurden zu Zylinder gerollt (R. WILLIAMS und H. M. KIRBY [24]) und in 5 L-Einmachgläser gestellt, die 150—200 cm³ Lösungsmittelgemisch enthalten. Die Gläser standen, nach Verschluß mit Cellophan, im temperaturkonstanten Raum bei 23°. Verwendet wurden zur zweidimensionalen Verteilung der „nichtpolaren" Aminosäuren die Lösungsmittelgemische von R. A. BOISSONNAS [1], d. h. zuerst tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser 2:2:1, dann tert. Butanol-Methanol-Wasser 4:5:1. Zur Trennung der „polaren" Aminosäuren wurde zuerst gepuffertes Phenol vom p_H 12,0, dann n-Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:5 verwendet. Zum Nachweis von Prolin und Oxyprolin wurde in einem gesonderten

Chromatogramm mit Isatin entwickelt, das bekanntlich mit diesen beiden Aminosäuren eine kräftige Blaufärbung gibt.

Andere Nachweise.

Tryptophan wurde mit der Reaktion nach Fürth [8] und mit der Reaktion nach Adamkiewicz-Hopkins in der Modifikation von S. Winkler [25] nachgewiesen. In den alkalischen Hydrolysaten gelingt die Identifizierung von Tryptophan nach Entwicklung mit gepuffertem Collidin [7]. Außerdem zeigen alle geprüften Proteinfraktionen ein Absorptionsmaximum bei 280 mμ. Tyrosin und Histidin sind nur in Fraktion II vorhanden, nicht jedoch in Fraktion I, wie die Paulysche Reaktion anzeigt.

Ergebnisse.

Der qualitative Nachweis der Aminosäuren.

Der qualitative Nachweis der im Hydrolysat der untersuchten Proteinpräparate vorhandenen Aminosäuren wurden nach den vorstehend angeführten Verfahren durch *zwei*dimensionale Chromatographie auf dem Papierbogen geführt. Bei bestimmten Aminosäuren kamen noch die oben angegebenen, direkten colorimetrischen und spektralphotometrischen Nachweise hinzu.

Die Analyse der beiden Proteinfraktionen hat folgendes Ergebnis: Die Hydrolysate von Fraktion I enthalten Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan und Prolin. Weitere Aminosäuren fehlen.

Die Hydrolysate der Fraktion II enthalten alle Aminosäuren der Fraktion I und außerdem: Phenylalanin, Tyrosin, Histidin, Methionin und Cystin.

Die Aminosäurenanalyse bestätigt also die elementaranalytische Feststellung, daß in Fraktion I kein Schwefel enthalten ist (I. Mitt., S. 451) und zeigt, daß nur die Proteine von Fraktion II schwefelhaltige Aminosäuren haben. Eine bequeme qualitative Unterscheidung beider Fraktionen ist also möglich mit Hilfe des Schwefelnachweises mittels Nitroprussidnatrium oder Bleisalz. Da in Fraktion I zudem sowohl Tyrosin wie Histidin fehlen, ist sie auch möglich mit Hilfe der Paulyschen Reaktion. Zum Nachweis der Abwesenheit von Fraktion II-Proteinen in Fraktion I ist man also nicht auf die pharmakologische Prüfung angewiesen.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren.

Die zweidimensionale Papierchromatographie erlaubte selbstverständlich auch grobe Schätzungen der relativen Mengen an Aminosäuren in den analysierten Proteinen und erleichterte die folgenden quantitativen Bestimmungen. Für diese selbst fanden wir sie jedoch nicht geeignet, mit keinem der in der Literatur empfohlenen Verfahren, und zwar aus mehreren Gründen: Befriedigende Trennung erhält man nur, wenn

höchstens 100 γ Hydrolysat pro Bestimmung eingesetzt werden. Die Ninhydrinfärbungen der einzelnen Komponenten sind dann aber zu schwach, besonders bei solchen Aminosäuren, die nur 1—3% des Gemisches ausmachen. Zudem werden die runden Farbflecken bei zweidimensionaler Wanderung oft nicht scharf getrennt. Für das Paar Leucin-Isoleucin ist das z. B. die Regel.

Bei eindimensionaler Entwicklung ist es hingegen möglich, die als *Strich* aufgetragene Substanzlösung wandern zu lassen, wie es z. B. von E. Hiller und Mitarb. [10] empfohlen wurde. Die Konzentration pro Zentimeter Startlinie kann niedrig gehalten werden, um eine scharfe Trennung zu erzielen; andererseits kann die Länge der Striche so groß gemacht werden, daß die Ninhydrinfärbungen der einzelnen Komponenten nach der Trennung für quantitative Auswertungen stark genug sind. Die von E. F. McFarren [5, 6, 7] angegebenen Trennungsverfahren, gekennzeichnet durch die Anwendung von gepufferten Verteilungsmedien und gepuffertem Papier, gestatten es, jede beliebige Aminosäure schon im eindimensionalen Chromatogramm zu isolieren. Wir fanden diese Trennungsmethode ausgezeichnet geeignet zu quantitativen Bestimmungen.

Die getrennten Aminosäuren werden mit Ninhydrin zur Reaktion gebracht; die Menge des entwickelten Farbstoffs läßt sich als Kupfersalz[23] in Lösung lichtelektrisch genau photometrieren. Zum quantitativen Bezug laufen in jedem Versuch, auf dem gleichen Papierbogen, bekannte Mengen der zu bestimmenden Aminosäuren mit, die ebenfalls als Kupfersalze der unter völlig gleichen Bedingungen entwickelten Ninhydrinfärbungen photometriert werden. Es ist also nach unseren Erfahrungen notwendig, in jedem Chromatographieversuch und für jede der zu bestimmenden Aminosäuren eine „individuelle" Eichkurve zu ermitteln.

Wir bestimmten derart *alle Aminosäuren der beiden Fraktionen* mit Ausnahme von Tryptophan und Histidin[1].

Der *Tryptophan*-Gehalt der Protein-hydrochloride wurde aus dem U.V.-Absorptionsmaximum ihrer wäßrigen Lösungen berechnet, außerdem auch durch U.V.-Absorptionsmessung ihrer alkalischen Hydrolysate.

Die colorimetrische Methode mit Glyoxylsäure nach Adamkiewicz-Hopkins in der Modifikation nach S. Winkler [25], bzw. D. C. Carpenter [3], ließ sich nicht auf Fraktion I anwenden, weil sich die Farbtöne mit dem Protein zu sehr von jenen des Tryptophanstandards unterscheiden. Mit Fraktion II war dieses Verfahren dagegen anwendbar. Als weitere Methode wurde die Berechnung des Tryptophan- und *Tyrosin*-Gehalts aus der U.V.-Absorptionskurve nach der Gleichung von T. W. Goodwin und J. A. Morton [9] verwendet.

In Fraktion II wurde mit der Paulyschen Reaktion in der Modifikation nach H. T. Macpherson [12] die Summe von Tyrosin und Histidin ermittelt. Da der Prozentsatz an Tyrosin aus papierchromatographischen und U.V.-Absorptionsmessungen bekannt ist, läßt sich *Histidin* aus der Differenz berechnen.

[1] Genauere Angaben zu dieser quantitativen Bestimmungsmethode werden in einer anderen Veröffentlichung mitgeteilt.

Die Ergebnisse der Aminosäurenbestimmungen sind in Tab. 1 wiedergegeben.

3 Proben der Fraktion I wurden unabhängig voneinander hydrolysiert und analysiert. Die Zahlen der 2. Spalte gehen aus je 5 bis 11 Einzelbestimmungen hervor, nämlich 3—7 Testwerten zur Aufstellung der Eichkurve und 2—4 Einzelbestimmungen des betreffenden Hydrolysats. Als Fehlergrenze wird nicht die Streuung der Einzelmessungen, sondern die Abweichung dieser, sich aus je 5—11 Meßwerten ergebenden Zahlen angegeben (3. Spalte). Die Mittelwerte in der Spalte 3 sind das Ergebnis von je 10—33 Einzelbestimmungen. Lediglich im Falle des Prolins und des Tryptophans sind es nur 3—5.

Der maximale Fehler liegt bei etwa 5%, oft bei nur 3%. Aminosäuren mit kleinen R_f-Werten, wie z. B. Arginin und Lysin bei der Verteilung mit Lutidin, lassen sich im allgemeinen genauer bestimmen, als solche mit großen, wie z. B. Valin, Leucin und Isoleucin. Asparaginsäure ist in der Bienengiftfraktion I am schwächsten vertreten; außerdem gibt sie von allen Aminosäuren mit Ninhydrin die schwächste Färbung. Ihre Bestimmung war daher am unsichersten.

Die Korrektur der Werte für Serin* und Threonin* ist auf Grund von Versuchen vorgenommen, in denen die prozentuale Zerstörung dieser beiden Oxysäuren genau unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse der Proteine ermittelt wurde (zu 8,3%, bzw. 2,6%).

Tabelle 1. *Die Aminosäuren-Analyse der Bienengift-Fraktion I.*

	g Aminosäure in 100 g Protein-hydrochlorid (mit 7,87% Cl)					% N bezogen auf Gesamt-N (17, 16%)
	Hydrolysat 1	2	3	Mittelwert	Maximaler Fehler (%)	
Glykokoll	6,47	6,15	6,27	6,30 ± 0,17	2,7	6,85
Alanin	6,10	6,20	6,18	6,16 ± 0,06	1,0	5,64
Valin	6,75	6,29	6,08	6,37 ± 0,38	6,0	4,43
Leucin	19,7	—	17,7	18,9 ± 1,2	6,4	11,77
			19,4			
Isoleucin	—	—	10,17	10,34 ± 0,18	1,7	6,44
			10,52			
Serin	3,40	3,39	3,55	(3,45 ± 0,10)	2,9	
korr.*				3,76		2,92
Threonin	7,31	7,39	7,92	(7,54 ± 0,38)	5,0	
korr.*				7,74		5,30
Lysin	13,10	—	12,80	12,95 ± 0,15	1,2	14,47
Arginin	13,37	—	13,36	13,36 ± 0,01	0,07	25,01
Asparaginsäure . .	—	1,28	1,36	1,32 ± 0,04	3,1	0,81
Glutaminsäure . .	9,70	9,27	9,42	9,46 ± 0,24	2,5	5,24
Tryptophan (U.V.)				6,2 ± 0,2	3,2	4,96
Prolin	—	—	3,5	3,5 ± 0,2	5,7	2,48
Summe				106,4		96,32

Bei der Analyse werden 96,32% des Gesamtstickstoffes wiedergefunden. Dazu käme der (bisher nicht bestimmte) Amidstickstoff der wahrscheinlich zum Teil amidierten Aminodicarbonsäuren. Würden Asparaginsäure und Glutaminsäure durchweg als Amide vorliegen, so wären 6,06% Amidstickstoff vorhanden.

100 g Protein-hydrochlorid der vorliegenden Zusammensetzung (mit 7,87% Cl^-) müßten theoretisch 116 g Aminosäuren plus Salzsäure im Hydrolysat ergeben. Addiert man zu der gefundenen Summe der Aminosäuren 106,4 g noch 8,1 g HCl hinzu, so erhält man fast diese Zahl.

Der elektrophoretisch von der Spitzenfraktion I abgetrennte Anteil Fraktion Ib, (siehe I. Mitt., S. 450) wurde nur durch Analyse eines Hydrolysats quantitativ untersucht. Die Mittelwerte der einzelnen Aminosäuren (aus je 5—10 Einzelbestimmungen, bei Tryptophan und Prolin jedoch aus nur 2 Einzelbestimmungen) können daher nicht die Genauigkeit der in Tab. 1 angegebenen beanspruchen. Sie fielen jedoch durchweg innerhalb der dort angegebenen Fehlergrenzen, mit Ausnahme von Threonin, Asparaginsäure und Isoleucin. Wir nehmen diese Abweichungen mit Rücksicht auf die geringe analytische Arbeit, die diesem Fraktion-Anteil gewidmet wurde, nicht als Anzeichen einer Verschiedenheit von der Spitzen-Fraktion I; die sonst sehr gute Übereinstimmung spricht hingegen für Identität.

Auch bei der chromatographisch abgetrennten *Fraktion II* begnügten wir uns mit der Analyse eines Hydrolysats, da diese Fraktion ja, wie mehrfach betont wurde, durchaus nicht einheitlich ist. Wir geben die Mittelwerte (das Ergebnis von je 5—10 Einzelbstimmungen) in Tab. 2 an, weil bemerkenswerte Unterschiede zu Fraktion I sichtbar werden.

Tabelle 2. *Die Aminosäuren-Analyse der Bienengift-Fraktion II.*

	g Aminosäure in 100 g Protein-hydrochlorid Mittelwerte	% N bezogen auf Gesamt-N (15, 57%)
Glykokoll	4,95	5,93
Alanin	4,64	4,69
Valin	4,15	3,19
Leucin	6,08	4,17
Isoleucin	7,08	4,85
Serin korr.*	3,30	2,82
Threonin korr.*	5,44	4,11
Lysin	13,6	16,73
Arginin	13,1	27,05
Asparaginsäure	11,2	7,57
Glutaminsäure	8,22	5,02
Tryptophan	2,79	2,46
Prolin	3,3	2,58
Tyrosin	2,41	1,20
Cystin	7,54	5,58
Methionin	0,76	0,46
Phenylalanin	2,43	1,32
Histidin	4,33	7,53
Summe	105,3	107,3

Durch diese Analyse wurden in Fraktion II 7% Stickstoff mehr gefunden, als durch Elementaranalyse. Besonders die Werte für Arginin und Lysin, die den N-Wert stark beeinflussen, dürften zu groß sein, da

in Anwesenheit von Cystin, wie wir fanden, die Bestimmung dieser beiden Aminosäuren zu hoch ausfällt. Auch die Werte von Glykokoll und Serin werden durch Cystin etwas erhöht. Ebenso stört bei den hier angewandten Verteilungsmedien Phenylalanin die Isoleucin-Bestimmung; auch diese wird zu hoch. Bei der Analyse von Fraktion I spielen diese Einflüsse keine Rolle, da dort ja sowohl Cystin wie Phenylalanin fehlen.

Die Molverhältnisse der Aminosäuren in den Bienengiftfraktionen.

Zur Berechnung ganzzahliger Molverhältnisse der Aminosäuren und daraus des Mindestmolekulargewichts eines Proteins sind immer einige Annahmen notwendig. Nach Analyse der Fraktion I sind wir in folgender Weise vorgegangen: Das Molverhältnis von Asparaginsäure wird als zu unsicher nicht zur Berechnung herangezogen; für die übrigen Aminosäuren trägt man graphisch ihre Molzahl als Funktion vom Gewicht des Protein-hydrochlorids auf. Auf diese Weise erkennt man leicht, daß die geringsten Abweichungen von der Ganzzahligkeit bei 9100 bzw. 16800 g Protein-hydrochlorid auftreten. Höhere Gewichte zu diskutieren, dürfte bei einer analytischen Fehlergrenze von durchschnittlich 4% wenig Sinn haben.

Bildet man nun zur rechnerischen Prüfung dieser Feststellungen die Summe der relativen Abweichungen der Molzahlen von der Ganzzahligkeit und trägt man sie als Funktion von Gewicht Protein-hydrochlorid auf, so stellt man fest, daß die Minima bei 9100 bzw. 16800 sich wie die Zahlen 2,3:1 verhalten.

Es wurde daher mit den Molverhältnissen in 16800 g Protein-hydrochlorid gerechnet (Tab. 3). Das Mindestmolekulargewicht für das freie, basische Protein ergibt sich dann (mit den in Tab. 3 angegebenen 140 Aminosäurenresten) zu 15400. Der doppelte Wert von 30800 ist von derselben Größenordnung wie der aus der Diffusionskonstante von Fraktion I ermittelte Wert von 35500. Besonders wenn die Fehlergrenze der Diffusionsmethode, eine mögliche Hydratation des Proteinmoleküls und vor allem eine mögliche Abweichung von der Kugelgestalt berücksichtigt wird, erscheint die Übereinstimmung gut.

Bemerkenswert in der Zusammensetzung des Bienengift-Hauptproteins ist der hohe Gehalt an Leucin und Isoleucin, die mit Glykokoll und Alanin zusammen einen starken Prozentsatz an „nichtpolaren Gruppen" bilden (Tab. 4). Der ebenfalls recht hohe Gehalt an Lysin und Arginin macht den weit im Alkalischen liegenden isoelektrischen Punkt des Proteins verständlich (p_H 11).

Fraktion II enthält im Vergleich viel weniger Leucin und Isoleucin, überhaupt weniger „nichtpolare Gruppen". Die relative Menge an basischen Aminosäuren ist ebenfalls hoch, doch sind die sauren Aminosäuren doppelt so stark wie in Fraktion I vertreten. Im ganzen über-

Tabelle 3. *Die Molverhältnisse der Aminosäuren in der Bienengift-Fraktion I.*

	Mol Aminosäure in 10000 g Protein-hydrochlorid	Anzahl der Reste in 16800 g Protein-hydrochlorid	Abweichung von der Ganzzahligkeit absolut	Abweichung von der Ganzzahligkeit in %	Prozentuale Häufigkeit der Reste (140 = 100%)
Glykokoll	8,39	14	+ 0,10	+ 0,7	10,0
Alanin	6,92	12	— 0,37	— 3,1	8,6
Valin	5,43	9	+ 0,13	+ 1,4	6,4
Leucin	14,43	24	+ 0,27	+ 1,1	17,1
Isoleucin	7,88	13	+ 0,23	+ 1,8	9,3
Serin	3,57	6	0	0	4,3
Threonin	6,50	11	— 0,08	— 0,7	7,9
Lysin	8,86	15	— 0,11	— 0,7	10,7
Arginin	7,66	13	— 0,12	— 0,9	9,3
Asparaginsäure . .	0,99	2	— 0,34	— 17,0	1,4
Glutaminsäure . .	6,42	11	— 0,22	— 2,0	7,9
Tryptophan . . .	3,03	5	+ 0,09	+ 1,8	3,6
Prolin	3,04	5	+ 0,11	+ 2,2	3,6
Summe		140			

Tabelle 4. *Die Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren-Gruppen in der Bienengift-Fraktion I.*

	Zahl der Gruppen in 16800 g Protein-hydrochlorid		Prozentuale Häufigkeit der Gruppen	
Nicht polare Gruppen[1]	82		58,6	
Polare Gruppen	58		41,4	
und zwar				
Oxyaminosäuren		17		12,1
Schwefelhaltige Säuren		0		0
Basische Säuren		28		20,0
Saure Säuren		13		9,3
Summe	140		100	

wiegen die polaren Gruppen. Kennzeichnend für Fraktion II ist außerdem die Anwesenheit von Histidin, von den aromatischen und von den schwefelhaltigen Aminosäuren. Dadurch wird, wie erwähnt, eine einfache chemische Prüfung auf die Abwesenheit von Fraktion II-Proteinen im Hauptbestandteil des Bienengiftes möglich. Es läßt sich derart z. B. ausschließen, daß der geringe Asparaginsäuregehalt der Fraktion I (siehe Tab. 2) von einer Verunreinigung durch die anderen Proteinbestandteile herrührt; es müßte sonst in dieser Fraktion auch Cystin nachzuweisen sein.

[1] Über die Bezeichnung der Gruppen siehe z. B. G. R. Tristram [20] und J. T. Edsall [4].

Die Abwesenheit schwefelhaltiger Aminosäuren in der Bienengifthauptkomponente ist auch aus dem Grunde besonders hervorzuheben, weil in allen anderen bisher untersuchten tierischen Eiweißgiften, vor allem in den Schlangengiften, Schwefel enthalten ist, zum Teil sogar in auffällig hohem Prozentsatz[1]. Von einigen Autoren sind sogar Beziehungen zwischen der Bindungsart der Schwefelgruppen in diesen Proteinen und deren toxischen Wirkungen angenommen worden. Nach dem Beispiel des Bienengiftproteins ist durchaus damit zu rechnen, daß auch in anderen tierischen Eiweißgiften toxische, aber schwefelfreie Komponenten enthalten sind. Nach W. Neumann und Mitarb. [14, 15] sind sowohl die Allgemeintoxizität, wie die lokale Reizung, die direkte Hämolyse, die Muskelwirkung, die curareartige und die nikotinartige Wirkung des Bienengiftes auf seine die Fraktion I bildende, auch mengenmäßig vorherrschende Komponente zurückzuführen. Keiner dieser toxikologischen Effekte des Bienengiftes kann also irgend etwas mit Schwefelgruppen im Molekül zu tun haben. Die Frage nach den besonderen, für die physiologischen Wirkungen der Bienengift-Hauptkomponente verantwortlichen Gruppen im Proteinmolekül bleibt unbeantwortet — wie bisher bei den anderen Eiweißgiften auch. Vermutlich ist sie in dieser Weise falsch gestellt.

In jedem Falle läßt die quantitative Aminosäurenanalyse im Molekül kein Gewicht mehr übrig für die Anwesenheit prosthetischer Gruppen, die nicht Aminosäuren sind; zu einem größeren Prozentsatz können solche nicht vorhanden sein.

Zu klären beabsichtigen wir noch die sterische Zugehörigkeit der nachgewiesenen Aminosäuren.

Das Protein-hydrochlorid (Fraktion I) dreht in wäßriger Lösung (p_H 6,0) die Ebene des polarisierten Lichts stark nach links, und zwar ist $[\alpha]_D^{20} = -96{,}3°$.

Als unsere quantitativen Analysen der beiden Bienengift-Fraktionen bereits im Gange waren, erhielten wir Kenntnis von einer an der Faculté des sciences der Pariser Universität 1950 eingereichten Dissertation [18], in der die Aminosäuren-Zusammensetzung des „Neurotoxins" des Bienengiftes untersucht wird. Der Autor, P. Tessier, verwendete als Ausgangsmaterial ein Präparat der Fa. Hoffmann la Roche, Basel, mit 14,05% N, 1,64% S und 0,00% P. Aus seinen Angaben läßt sich entnehmen, daß es nach den Vorschriften von Hahn und Mitarb. aus dem Rohgift dargestellt ist, nämlich durch Extraktion mit 60%igem Äthanol, Fällung mit Ammoniak und 56–60tägiger Dialyse. Die vor dem 35. Tag dialysierenden Anteile sollen „krampferregend" wirken, die nachher durchdiffundierenden „Atemzentrumlähmend". Die letzteren sind es, die zur Analyse gelangten. Nach unserer Kenntnis

[1] Einige Literatur über tierische Gifte bei F. Flury und K. Gemeinhardt in B. Flaschenträger, Physiologische Chemie Bd. I, 1245, F. Springer, Berlin 1951; über Schlangengifte F. Micheel [13], K. Slotta [17]; über das Gift der Brillenschlange H. Wieland u. W. Konz [22]; über Skorpionengift Chr. Tetsch und K. Wolff [19].

müssen sie (schon des Schwefelgehalts wegen) ein Gemisch von Proteinen gewesen sein. TESSIER gelangt, mit anderer analytischer Methodik als wir sie anwandten, zu dem Schluß, daß das Bienengift-„Neurotoxin", seine Einheitlichkeit vorausgesetzt, ein Protein sei mit einem (aus dem Aminosäurengehalt ermittelten) Mindest-Molekulargewicht von 21000—22000 und der Zusammensetzung Arg_{10} His_1 Lys_{11} (Asp $NH_2)_7$ (Glu $NH_2)_9$ Try_7 Phe_1 Tyr_2 Gly_{20} Ala_{13} Ser_9 Cy_2 Thr_{12} Val_8 Leu_{14} $Ileu_7$ Pro_4 Me_7. Es werden also die 18 Aminosäuren gefunden, die auch in unserer Fraktion II enthalten und allgemein Bestandteile der meisten Proteine sind, doch in ganz anderen Molverhältnissen. Vergleicht man diese Verhältnisse mit den von uns in Fraktion I und in Fraktion II gefundenen, so kommt man zu dem Ergebnis, daß auch keine Proteinmischung, wie sie im „Pikrat-Gift" vorliegt, den TESSIERschen Analysen zugrunde gelegen haben kann. Man ist also zu dem Schluß gezwungen, daß TESSIER entweder ein Präparat analysiert hat, das durch andere, nicht im Giftsekret enthaltene Eiweißkomponenten verunreinigt war, oder daß die Proteine des Sekrets der Bienengiftdrüse unterschiedliche Zusammensetzung haben können. Die letztere Möglichkeit hätte verständlicherweise grundsätzliche Bedeutung und es wäre interessant zu untersuchen, ob solche Unterschiede etwa durch die Bienenrasse oder durch verschiedene Ernährung bedingt sein können.

Gesichert ist durch die Untersuchungen von E. TROJAN [21] und P. RIETSCHEL [16], daß das ausgeschiedene und mit Hilfe der Stechborsten in das Opfer gelangende Gifttröpfchen der Honigbiene nur aus der „sauren" Giftdrüse stammt, und keine Vermengung mit dem Sekret der „alkalischen" DUFOURschen Drüse erfährt. Die in der Bienengift-Literatur zuweilen wieder auftauchende, alte Behauptung von CARLET, daß das Giftsekret eine Mischung der Sekrete beider Drüsen sei und erst dadurch seine Wirksamkeit erhielte, ist sicherlich unrichtig. Doch ist die Möglichkeit der Verunreinigung des Giftsekrets bei seiner Gewinnung sehr zu beachten: Nicht geeignet zur Untersuchung seiner Komponenten sind Präparate, die stark mit Stacheln vermengt sind und all den Adnexen, die nach dem Stich mit dem Stachel selbst aus dem Bienenhinterleib herausgerissen werden.

Wir danken Herrn Dr. K. A. FORSTER, Illertissen, für die Überlassung von Ausgangsmaterial, dem Fonds der Chemie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Hilfe bei der Beschaffung von Apparaten.

Zusammenfassung.

Es wird die Aminosäurenzusammensetzung des basischen Proteins ermittelt, welches die Hauptfraktion des Bienengiftes (Fraktion I) bildet. Das Gemisch der übrigen Bienengiftproteine (Fraktion II) wird ebenfalls einer Aminosäurenanalyse unterworfen.

Fraktion I enthält keine schwefelhaltigen Aminosäuren; diese sind nur in Fraktion II enthalten.

Aus der Hydrolyse beider Fraktionen ergeben sich keine Anzeichen für die Anwesenheit prosthetischer Gruppen.

Literatur.

[1] BOISSONNAS, R. A.: Helvet. chim. Acta **33**, 1966 (1950). — [2] BULL, H. B., J. W. HAHN and V. H. BAPTIST: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 550 (1949). — [3] CARPENTER, D. C.: Analyt. Chem. **20**, 536 (1948). — [4] EDSALL, J. T.: Erg. Physiol. **46**, 308 (1950). — [5] McFARREN, E. F.: Analyt. Chem. **23**, 168 (1951). — [6] McFARREN, E. F., K. BRAND a. H. R. RUTKOWSKI: Analyt. Chem. **23**, 1146 (1951). — [7] McFARREN, E. F., a. J. A. MILLS: Analyt. Chem. **24**, 650 (1952). — [8] FÜRTH,

O. v.: Erg. Physiol. **24**, 52 (1925). — [9] Goodwin, T. W., and J. A. Morton: Biochemic. J. **40**, 628 (1946). — [10] Hiller, E., F. Zinnert u. G. Frese: Biochem. Z. **323**, 245 (1952). — [11] Longsworth, L. G.: J. Amer. Chem. Soc. **67**, 1109 (1945). — [12] Macpherson, H. T.: Biochemic. J. **36**, 59 (1942). — [13] Micheel, F., u. H. Schmitz: Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 703 (1938). — [14] Neumann, W., u. E. Habermann: Naturwiss. **39**, 286 (1952). — [15] Neumann, W., E. Habermann u. H. Hansen: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 130 (1953). — [16] Rietschel, P.: Z. Morph. Oekol. Tiere **33**, 313. — [17] Slotta, K.: Experientia **9**, 81 (1953). — [18] Tessier, P.: Thése de doctorat de l'université Paris **1950**. — [19] Tetsch C., u. K. Wolff: Biochem. Z. **290**, 394 (1937). — [20] Tristram, G. R.: Advanc. Prot. Chem. **5**, 84 (1949). — [21] Trojan, E.: Z. Morph. Oekol. Tiere **19**, 678 (1930). — [22] Wieland, H., u. W. Konz: Sitzungsber. d. Math. Naturwiss. Abt. d. Bayer. Akademie d. Wiss. zu München **1936**, 177. — [23] Wieland, Th., and E. Kawerau: Nature **168**, 77 (1951). — [24] Williams, R., and H. M. Kirby: Science **107**, 481 (1948). — [25] Winkler, S.: Z. Physiolog. Chem. **228**, 50 (1934).

Sonderdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chem. 297. Bd. (1954)

Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Crotoxin

(Schlangengifte IV)

Von

F. G. Fischer und **Helmut Dörfel**

Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg

(Der Schriftleitung zugegangen am 11. Juni 1954)

Es ist bisher nur in zwei Fällen gelungen, aus Schlangengiften kristallisierte, hochwirksame Proteine zu erhalten: Aus dem Gift der Brasilianischen Klapperschlange (*Crotalus terrificus terrificus*) gewannen Slotta und Fraenkel-Conrat 1938 das in quadratischen Blättchen sich ausscheidende Crotoxin[1]; aus dem Giftsekret der Brillenschlange (*Naja naja*) wurde 1941 von S. S. De eine der Komponenten, das „Hämolysin", in feinen Nädelchen dargestellt[2].

Das kristallisierte Crotoxin enthält die neurotoxische und die hämolytische Aktivität des Rohgiftes, nicht mehr jedoch seine blutkoagulierende und proteolytische. Nach Slotta ist es „nicht nur die für die Wirkung des Giftes ausschlaggebende, sondern auch mengenmäßig die Hauptkomponente des Klapperschlangengiftes[3]".

Wir verdanken dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Prof. K. Slotta, São Paulo, 30 mg des kristallisierten Proteins, die uns zu der hier mitgeteilten, quantitativen Aminosäuren-Bestimmung gedient haben.

Nach brieflicher Mitteilung von Herrn Prof. Slotta war das Crotoxin aus verdünnter Lösung schön auskristallisiert und (zur Vermeidung von Zersetzungen[3]) nicht nochmals umgefällt worden. Der „Giftwert" des Präparates, bestimmt nach der Methode von Reed und Munch[4] lag bei 3700 (. . . „das heißt, daß 0,27 γ ein g Maus bei intramuskulärer Injektion tötet. Es handelt sich also um ein außergewöhnlich aktives Crotoxin-Präparat").

Wir führten die Analyse nach dem von uns kürzlich näher beschriebenen Verfahren[5] aus: Die Aminosäuren werden nach der eindimensionalen papierchromatographischen Trennung mit Hilfe gepufferter Medien als Kupfersalze ihrer Ninhydrin-Reaktionsprodukte photometrisch bestimmt.

Eine Identifizierung der im Crotoxin enthaltenen 18 Aminosäuren ist schon von K. Slotta und J. Primosigh mitgeteilt worden[6].

[1] K. Slotta u. H. Fraenkel-Conrat, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1076 [1938].
[2] S. S. De, Sci. and Cult. **6**, 675 [1941].
[3] K. Slotta, Experientia [Basel] **9**, 81 [1953].
[4] Reed u. J. C. Munch, Amer. J. Hyg. **27**, 493 [1938].
[5] F. G. Fischer u. H. Dörfel, Biochem. Z. **324**, 544 [1953].
[6] K. H. Slotta u. J. Primosigh, Nature [London] **168**, 696 [1951].

Die Aminosäuren-Zusammensetzung von Crotoxin

	Zahl der Einzelbestimmungen	Mittlere Streuung d. Einzelbe t. in %	g Aminosäure aus 100 g Crotoxin	% N bezogen auf Gesamt-N (15,86%)*	Mole Aminosäure-Rest in 10^5 g Crotoxin	Mole Aminosäure-Rest in 28600 g Crotoxin
Glykokoll	8	2,9	6,52	7,67	86,9	24,9
Alanin	8	2,9	4,62	4,58	51,9	14,8
Valin	16	5,0	1,73	1,31	14,8	4,2
Leucin	8	5,0	3,62	2,43	27,6	7,9
Isoleucin	8	4,5	2,96	1,99	22,6	6,5
Phenylalanin	16	4,7	9,64	5,15	58,4	16,7
Prolin**	16	2,6	5,31	4,07	46,1	13,2
Tryptophan						
UV-Bestimmung***	1		4,18	3,61	20,5	5,9
Tyrosin	24	3,0	9,53	4,64	52,6	15,0
UV-Bestimmung***	1		(9,85)			
Serin**	8	4,1	(4,61)			
korr.†			5,03	4,23	47,9	13,7
Threonin	8	0,8	(4,84)			
korr.†			4,97	3,68	41,7	11,9
Cystin ½	16	1,4	12,25	9,01	102,0	29,2
Methionin	16	4,2	2,09	1,24	14,0	4,0
Lysin	8	2,2	6,30	7,61	43,1	12,3
Arginin	8	5,3	8,48	17,2	48,7	13,9
Histidin**	8	3,0	2,25	3,84	14,5	4,2
Asparaginsäure	8	4,8	12,22	8,10	91,8	26,3
Glutaminsäure	8	2,1	13,86	8,31	94,2	26,9
Summe			115,56	98,67		252

* Wert von K. Slotta u. W. Forster[7].
** Siehe die methodischen Angaben.
*** Nach T. W. Goodwin u. J. A. Morton, Biochem. J. **40**, 628 [1946].
† Siehe G. Fischer u. H. Dörfel[5].

Die Summe der gefundenen Aminosäuren-Prozentwerte erreicht nahezu den theoretischen Wert (115,80). Anzeichen von nichtidentifizierten, ninhydrinpositiven Substanzen traten in keinem von unseren Chromatogrammen auf*. Der etwas größere Fehlbetrag an Stickstoff dürfte zum Teil auf den (nicht bestimmten) Amidstickstoff entfallen. Bei Betrachtung der Zahlen der beiden letzten Säulen ist im Auge zu behalten, daß die Fehlergrenze der Bestimmungsmethode bei den meisten Aminosäuren zwar auf nicht mehr als ± 2% angegeben werden kann, daß jedoch etwaige spezifische Verluste bei der Hydrolyse sich einer genaueren Schätzung entziehen. Das Mindestmolekulargewicht von 28 600 entspricht dem kleinsten Wert, bei dem die Summe

[7] K. Slotta u. W. Forster, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1082 [1938]; Memórias do Instituto Butantan **12**, 513 [1938].

* Nur in den mit Phenol von p_H 1 entwickelten Chromatogrammen war an der Front vor dem Phenylalanin ein sehr schwacher Fleck zu beobachten. Er wurde mit dem Fleck des Phenylalanins gemeinsam ausgewertet, da er sich nicht von ihm abtrennen ließ und nur wenige Prozente von diesem betrug.

der Abweichungen der gefundenen Molverhältnisse der einzelnen Aminosäuren von ganzen Zahlen am kleinsten ist (siehe unter „Methodische Angaben"). Ein weiteres Minimum dieser Summe der Abweichungen läßt sich bei einem Mol.-Gewicht von 35 000 feststellen.

Einen genaueren Sinn erhielten die Angaben der letzten Säule (auf ganze Zahlen auf- oder abgerundet) nur unter der Annahme, daß das kristallisierte Crotoxin ein völlig einheitliches Protein darstellt, d. h. aus Molekülen nicht nur gleicher Größe, sondern auch identischer Aminosäuren-Zusammensetzung besteht.

Nach Gralén und Svedberg[8] ergibt sich aus der Sedimentation von Crotoxin in der Ultrazentrifuge ein Molekulargewicht von 30 000 Das Verhalten des Proteins bei der Diffusion und Sedimentation spricht für eine homogene Substanz.

Im übrigen ist die Frage der Einheitlichkeit des kristallisierten Crotoxins von Slotta[3] diskutiert worden; sie soll hier nicht weiter behandelt werden.

Der hohe Schwefelgehalt des Toxins ist auch im Zusammenhang mit den Problemen seiner Aktivität und Inaktivierung betont worden[3, 9]. Slotta und Forster[7] hatten Cystin (durch Reduktion und Bestimmung nach Folin und nach Sullivan) zu 13.20% ermittelt, Methionin (durch Bestimmung des entmethylierten Methionins nach H. D. Bärnstein) zu 1,36%. Die Werte des von uns analysierten Präparates liegen für Cystin 1,0% niedriger, für Methionin jedoch 0,7% höher, so daß bei der Schwefelbilanz (Cystin 3,23%, Methionin 0,45%; Annahme des von Slotta und Forster angegebenen S-Wertes von 4,03%) nur 8,7% fehlen. Die Bestimmungen der genannten Autoren hatten ebenfalls einen geringen Fehlbetrag (5%) ergeben, so daß die Unwahrscheinlichkeit des Vorkommens von anderen schwefelhaltigen Bestandteilen außer Cystin und Methionin betont werden konnte.

Über den Tyrosin- und den Tryptophan-Gehalt von Crotoxin lagen schon quantitative Angaben von H. und J. Fraenkel-Conrat vor[9]. Diese Autoren haben Tyrosin nach saurer Hydrolyse und Tyrosin plus Tryptophan nach alkalischer Hydrolyse mit Hilfe von Folins Reagens bestimmt. Die von uns ermittelten Werte (denen wir aus Gründen der Methodik die höhere Genauigkeit zusprechen möchten) liegen bei Tyrosin 2,5% niedriger, bei Tryptophan 0,9% höher.

Schließlich seien zur Veranschaulichung der Molverhältnisse der verschiedenen Gruppen von Aminosäuren in Crotoxin folgende, aus unserer Analyse sich ergebende Prozentzahlen angegeben:

„Nichtpolare" Aminosäuren	37,4%	Basische Aminosäuren	12,1%
Saure Aminosäuren	21,2%	Oxy-aminosäuren	16,1%
		Schwefelhaltige Aminosäuren	13,2%

[8] N. Gralén u. T. Svedberg, Biochem. J. **32**, 1373 [1938].

[9] H. Fraenkel-Conrat u. J. Fraenkel-Conrat, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **5**, 98 [1950].

Methodische Angaben

Es wurde zur Voranalyse ein Hydrolysat aus 5 mg Crotoxin, zur Hauptanalyse ein solches aus 10 mg verwendet. Hydrolyse 24 Stdn. bei 100° mit 1 ccm eines Gemisches aus gleichen Volumteilen 6-*n*.HCl und 90-proz. Ameisensäure. Im übrigen sei auf die früheren Angaben verwiesen[5]. Die Ausmessungen der Färbungen aus Prolin und Histidin auf den Papierstreifen wurden im Beckman-Photometer mit Hilfe eines selbstgebauten Zusatzgerätes ausgeführt, das die Flecken in jeder gewünschten Ebene im Lichtstrahl vorbeizuführen gestattet.

Die Bestimmung von Serin neben größeren Mengen Cystin gelingt nicht direkt, weil diese Säuren im Chromatogramm mit Phenol von p_H 12 nicht getrennt werden. Doch führt eine Differenzmethode zu genauen Werten (nach Versuchen von H. Bohn): Der Cystin-Gehalt der Analysenmischung geht aus dem Chromatogramm mit saurem Phenol hervor. Auf die Startlinie des mit Phenol von p_H 12 zu entwickelnden Chromatogramms wird außer Analysen- und Vergleichslösung auch Cystin aufgetragen, und zwar in der ermittelten, auch in den beiden Lösungen annähernd vorhandenen Menge. Zur Auswertung der gewanderten Aminosäuren wird die Extinktion des Kupfersalzes aus dem Ninhydrin-Fleck des reinen Cystins abgezogen von der Extinktion der Lösung aus dem Fleck der nichtgetrennten Cystin + Serin. Die Berechnung der Serinkonzentration in der Analysenlösung erfolgt aus dem Differenzwert wie üblich.

Zur Bestimmung von Prolin werden Analysen- und Vergleichslösung punktförmig auf die Startlinie aufgetragen. Der Papierbogen ist vorher mit 0,067-*m*. Phosphatpuffer von p_H 6.2 getränkt, dann getrocknet worden. Entwickelt wird 40 Stdn. absteigend (tert. Butanol, Methyläthylketon, Phosphatpuffer p_H 6.2; 2:2:1; v/v). Durch Verwendung von gepuffertem Papier und von Pufferlösung wird eine schärfere Trennung erzielt, als durch die sonst übliche Verwendung von Wasser (Versuche von H. Bohn). Nach der Farbentwicklung mit Isatin erfolgt die Photometrierung auf dem paraffingetränkten Papier mit Licht der Wellenlänge 610 mμ. Die planimetrisch ermittelten Flächen der Verteilungskurven werden zu jenen aus den Flecken der Vergleichsmischung in Beziehung gebracht. Die Maximum-Density-Methode ergibt ungenauere Werte!

Die Bestimmung des Histidins wird ebenfalls durch Photometrierung (bei 516 mμ) der mit Paulys Reagens auf dem Papier gebildeten Flecken, Planimetrierung der Kurven und Bezug auf die aus der Vergleichslösung erhaltenen Flächenwerte ausgeführt. Punktförmige Auftragung der Lösungen, 15-stdg. aufsteigende Entwicklung mit der organischen Phase des Gemisches *n*-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5; v/v). Der 1 Stde. im Luftstrom von 40° getrocknete Papierbogen wird mit einer frisch bereiteten 0,5-proz. Lösung von festem Diazoniumsalz der Sulfanilsäure in 0,2 *m*.Natriumcarbonat-Lösung doppelseitig besprüht und nach erneutem Trocknen im Luftstrom von 20° zur Photometrierung mit Paraffinöl getränkt.

Zur Ermittlung des wahrscheinlichsten Mindestmolekulargewichtes des analysierten Proteins wird am bequemsten zunächst der angenäherte Wert graphisch aufgesucht. Man trägt in einem Koordinatensystem auf Millimeterpapier für jede Aminosäure die analytisch ermittelte Molzahl als Funktion des Proteingewichtes ein. Durch Verbindung der Werte für die Mole Aminosäuren (als Ordinaten) in z. B. $3 \cdot 10^4$ g Protein (als Abszisse) mit dem Koordinaten-Nullpunkt erhält man eine Schar von Geraden, deren Steigung die Häufigkeit der betreffenden Aminosäuren im Protein veranschaulicht. Nun sucht man durch Verschiebung eines Lineals parallel zur Ordinate jenen Abszissenwert, d. h. jenes Molekulargewicht, auf, bei dem die Molzahlen der meisten Aminosäuren möglichst wenig von ganzen Zahlen abweichen. Im Idealfall würden auf allen Geraden der fächerförmigen Schar die Punkte mit der Abszisse des Mindestmolekulargewichtes ganzzahlige Ordinaten haben. Falls mehrere Abszissen minimaler Abweichungen von der Ganzzahligkeit der Aminosäuren-Molzahlen sich graphisch erkennen lassen, so werden für die in Frage kommenden Molekulargewichte diese

Abweichungen errechnet. Der Molekulargewichtswert ist am wahrscheinlichsten, bei dem die Summe der Abweichungen am kleinsten ist. Da der Ort der kleinsten Abweichungen sich graphisch nicht auf 100 Einheiten genau erkennen läßt, ist zu seiner genaueren Feststellung ebenfalls Berechnung und Summierung der Abweichungen von der Ganzzahligkeit notwendig.

Bei dieser graphischen bzw. rechnerischen Ermittlung des Mindest-Molekulargewichtes wird man zunächst jene Aminosäuren außer Betracht lassen, die in sehr hohen Prozentsätzen vorhanden sind oder deren Bestimmung aus irgendwelchen anderen Gründen unsicher erscheint (z. B. Aminosäuren, die bei der Hydrolyse partiell zerstört werden).

Herrn Prof. K. Slotta, São Paulo, danken wir für die Überlassung des untersuchten Crotoxin-Präparates, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Hilfe mit Apparaten.

Zusammenfassung

Es werden die Ergebnisse einer quantitativen Analyse der im kristallisierten Crotoxin enthaltenen Aminosäuren mitgeteilt.